

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Optimização da incerteza da determinação, por cromatografia iónica, da
composição maioritária e vestigial de soluções salinas**

Joana Filipa Palmeira Rodrigues

Dissertação
Mestrado em Química
Química Analítica

2012

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Optimização da incerteza da determinação, por cromatografia iónica, da
composição maioritária e vestigial de soluções salinas**

Joana Filipa Palmeira Rodrigues

Dissertação orientada por:

Doutora Cristina Oliveira

Doutor Ricardo Bettencourt da Silva

Mestrado em Química

Química Analítica

2012

Agradecimentos

Agradeço aos meus orientadores, Doutora Cristina Oliveira e Doutor Ricardo Bettencourt Silva, pela orientação e transmissão de conhecimentos, disponibilidade para o esclarecimento de dúvidas, troca de ideias, apoio e incentivo a seguir com pensamento positivo no decorrer do trabalho.

À Professora Doutora Filomena Camões, que proporcionou novos objectivos para o trabalho realizado e mostrou-se sempre disponível para ajudar.

Um especial agradecimento especial ao Departamento de Geologia, na pessoa da Professora Catarina Silva pela disponibilização do cromatógrafo iónico. Ao Luís Carita pela companhia e tempo prestado para a explicação do funcionamento do aparelho e partilha de conhecimentos.

Não menos importante, agradeço também ao Aquário Vasco da Gama, especialmente à Dra. Fátima Gil, por possibilitar a recolha de amostras e por ceder toda a informação necessária acerca do funcionamento e manutenção dos aquários que ajudaram a complementar este trabalho.

Agradeço à minha Mãe e à minha Irmã pela demonstração de confiança ao apoiarem sempre as minhas decisões e pelo incentivo que me deram força para continuar, agora e sempre.

Ao João Rodrigues, pela compreensão, preocupação, apoio e momentos de descontração ao fim de cada dia e cada semana, mas especialmente pelo esforço para perceber este trabalho e me poder, ou pelo menos tentar, ajudar.

À Janina Ventura, por sempre me demonstrar que posso contar com a sua ajuda e motivação, e pela partilha de momentos de boa disposição.

Ao colega de laboratório, Alejandro Arias, pela companhia e ânimo que tornaram os dias de trabalho mais leves.

Aos colegas de mestrado, Beatriz, Tiago e Rita, pela partilha, animação, companhia e disponibilidade para ajudar.

E à Isabel Ruiz pela ajuda prestada na fase final deste trabalho.

Muito obrigada a todos.

A determinação de componentes em matrizes complexas representa um desafio não só para a identificação e quantificação desses componentes, mas também na obtenção de resultados de elevada qualidade. Deste desafio surgem como objectivos o desenvolvimento de um método de análise e a optimização da incerteza da determinação, por cromatografia iónica com supressão e detecção condutimétrica, da composição iónica de amostras salinas. Nas determinações da composição aniónica das amostras, recorreu-se ao método de adição de padrão com vista a assegurar a compensação de efeitos de matriz.

Para a optimização da incerteza da determinação, foi realizado um estudo detalhado do desempenho do cromatógrafo iónico ao longo da sua gama de resposta e o desenvolvimento de estratégias de diluição da amostra e de adição de padrão capazes de assegurar a produção de resultados da mais elevada qualidade metrológica. Foi, ainda, desenvolvida uma estratégia de controlo da qualidade dos resultados das medições.

Foi avaliada a presença de impurezas de sais de nitrato e sulfato em cloreto de sódio purificado e a composição aniónica de águas salgadas, nomeadamente, as concentrações de F^- , Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- e SO_4^{2-} .

Após o desenvolvimento da estratégia de optimização da incerteza, concluiu-se que tendo o conhecimento prévio aproximado da composição da amostra, será possível definir a diluição da solução amostra e determinar o valor da concentração máxima de ião a ser adicionada na calibração pelo método de adição de padrão, de forma a minimizar a incerteza da medição. Verificou-se que, para todos os iões, a incerteza expandida relativa estabiliza a valores inferiores a 5 %, à medida que a concentração de ião na amostra diluída aumenta.

Os resultados obtidos para a generalidade das amostras e o controlo interno da qualidade das medições implementado corroboram a afirmação quanto à qualidade metrológica dos resultados optimizados em termos de incertezas obtidas.

Palavras-chave: Amostras salinas; cromatografia iónica; método de adição de padrão; incerteza de medição.

Abstract

The determination of components in complex matrices is challenging, not only to identify and quantify these components, but also to obtain high quality results. An example of such goals is the measurement, and optimization of its uncertainty, of the ionic composition of saline samples by ion chromatography with conductimetric detection. Usually, the standard addition method is used in the determinations of the anionic composition of saline samples to ensure matrix effects compensation.

A detailed study of the performance of the ion chromatograph throughout its response range was performed to support the development of strategies for sample dilution and standard addition to ensure the production of results of the highest metrological quality. A quality control plan was defined to check routine measurements quality.

The measurement procedure was used to evaluate the presence of sulfate and nitrate salts impurities in purified sodium chloride and the anionic composition of sea water, in particular the concentrations of anions F^- , Cl^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- and SO_4^{2-} .

It was concluded from this study that once prior approximate knowledge of the composition of the sample is gathered, it is possible to define the dilution of the sample solution and determine the maximum concentration of ions to be added in the calibration by standard addition method, in order to minimize the measurement uncertainty.

It was found that, for all ions, the relative expanded measurement uncertainty stabilizes to values below 5% as the concentration of ion in the diluted sample increases.

The results of the majority of samples and the internal quality control measurements produced corroborate the assertion regarding the metrological quality of optimized results in terms of uncertainties obtained.

Keywords: saline samples; ion chromatography; standard addition method, measurement uncertainty.

Abreviaturas e símbolos

- A_i – Sinal obtido para a solução i
- b – Declive ou coeficiente angular da curva analítica
- CQ – Controlo de qualidade
- CTA⁺ - Ião cetiltrimetilamónio
- dil – Diluição da amostra ou padrão
- EIC - Cromatografia iónica electrostática
- EIL – Ensaio interlaboratoriais
- F_{cal} – Valor calculado de F no teste de Fisher
- F_{tab} – Valor tabelado do teste de Fisher, para $(n-1)$ graus de liberdade
- G – Condutância eléctrica
- GUM – Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement
- H – Altura de um prato teórico
- HIPC - Cromatografia iónica de alta resolução
- IC - Cromatografia iónica
- k - factor de expansão
- k_R – Factor de retenção
- K – Constante da célula de condutividade
- L – comprimento da coluna analítica
- LD - Limite de detecção
- LQ - Limite de quantificação
- m – Massa pesada
- M - número de leituras utilizadas para determinar o teor da amostra
- MRC – Materiais de referência certificados
- MRI – Materiais de referência internos
- MS - Espectrometria de massa
- n – número de leituras de padrões utilizados no traçado da curva analítica
- N – Número de pratos teóricos
- p – Número de medidas replicadas
- $R'_{m\acute{a}x}$ – Razão de concentrações de padrões de calibração associada à máxima incerteza padrão relativa
- R_s - Resolução entre dois picos num cromatograma

RSD – Desvio padrão relativo

s – Desvio padrão da resposta instrumental

STD – Solução padrão

s_{xE} – desvio padrão associado a x_E

$s_{y/x}$ – desvio padrão residual da curva analítica

t_M – Tempo morto

t_R – Tempo de retenção

t_S – Tempo que o analito passa na fase estacionária

UV – Detector de absorção molecular de radiação Ultravioleta-visível

U_y – Incerteza expandida associada a y

U'_y – Incerteza expandida relativa associada a y

u_x – Incerteza padrão associada a x

u'_x – Incerteza padrão relativa associada a x

u_x^{Cal} – Incerteza padrão da componente de calibração associada a x

u_x^{Rep} – Incerteza padrão da componente de repetibilidade associada a x

V - Volume

VIM – Vocabulário Internacional de Metrologia

w – Fração mássica de analito

W – Largura da base de um pico num cromatograma

$W_{1/2}$ – Largura de um pico, a meia altura, num cromatograma

x_E – Concentração obtida por extrapolação da curva analítica

x_i – concentração de cada um (i) dos n padrões de calibração

\bar{x} – valor médio das concentrações dos padrões de calibração

\bar{y}_a – Valor médio das n leituras da amostra

\bar{y} - Valor médio das N leituras dos padrões de calibração

α - coeficiente de expansão volúmica

α_s – Selectividade

β – Concentração de analito na solução amostra diluída

κ – Condutividade eléctrica

ΔT – Variação de temperatura

λ_+ - Condutividade molar limite

Índice

Agradecimentos.....	vii
Resumo.....	ix
Abstract.....	xi
Abreviaturas e símbolos.....	xv
Índice.....	xix
Índice de figuras.....	xxiii
Índice de tabelas.....	xxv
1. Introdução.....	1
1.1. Água do mar e amostras salinas.....	1
1.2. Caracterização química de amostras salinas.....	3
2. Método analítico utilizado	6
2.1. Cromatografia – Fundamentos.....	6
2.2. Cromatografia iónica.....	9
2.2.1. Equipamento.....	10
2.3. Calibração analítica.....	14
2.3.1. Método de adição de padrão	14
3. Validação do procedimento de medição.....	16
3.1. Parâmetros de desempenho do método experimental.....	16
3.1.1. Selectividade	16
3.1.2. Gama de trabalho/linearidade	16
3.1.3. Limite de detecção e limite de quantificação	16
3.1.4. Precisão da medição	17
3.1.5. Exactidão e Veracidade da medição	18
4. Incerteza de medição.....	18
4.1. Abordagem Subanalítica ou “Passo a Passo”	19
4.1.1. Especificação da mensuranda e do procedimento de medição	20
4.1.2. Identificação das fontes de incerteza	20
4.1.3. Quantificação das componentes de incerteza	20
4.1.3.1. Incerteza associada a uma pesagem	21
4.1.3.2. Incerteza associada a uma medição de volume	21

4.1.3.3.	Incerteza associada a volumetrias sucessivas	23
4.1.3.4.	Incerteza associada a resultados obtidos por métodos instrumentais de análise	23
4.1.4.	Cálculo da incerteza combinada e incerteza expandida	25
4.2.	Optimização da incerteza de medição.....	26
4.2.1.	Resposta instrumental	26
4.2.2.	Incerteza expandida relativa (U'_y)	27
5.	Controlo de qualidade.....	28
5.1.	Controlo interno.....	28
5.2.	Controlo externo.....	29
6.	Metodologia experimental.....	30
6.1.	Materiais, reagentes e amostras.....	30
6.2.	Preparação de padrões.....	31
6.2.1.	Optimização da incerteza de medição	31
6.2.2.	Método de adição de padrão	31
6.2.2.1.	Amostras de cloreto de sódio	31
6.2.2.2.	Amostras de água salgada e água de mar artificial	31
6.3.	Preparação de amostras.....	32
6.3.1.	Amostras de cloreto de sódio	32
6.3.2.	Amostras de água salgada	32
6.3.3.	Água de mar artificial	32
6.4.	Procedimento.....	33
6.4.1.	Optimização do método instrumental para a análise de amostras	33
6.4.2.	Optimização da incerteza de medição	33
6.4.3.	Análise de amostras de cloreto de sódio pelo método de adição de padrão	35
6.4.3.1.	Determinação do ião nitrato	35
6.4.3.2.	Determinação do ião sulfato	36
6.4.4.	Análise de amostras de água salgada e de água de mar artificial pelo método de adição de padrão.....	36

6.4.4.1.	Determinação dos iões fluoreto, nitrito, brometo, nitrato e sulfato	36
6.4.4.2.	Determinação do ião cloreto	38
7.	Apresentação e discussão dos resultados.....	39
7.1.	Optimização da incerteza de medição.....	39
7.1.1.	Cálculo da incerteza associada à resposta instrumental (exemplo – ião nitrato).....	39
7.1.2.	Cálculo da incerteza expandida relativa, U'_y	46
7.2.	Análise de amostras de sal pelo método de adição de padrão.....	52
7.2.1.	Determinação da concentração de ião nitrato e ião sulfato no sal	52
7.2.2.	Cálculo da incerteza de medição para a determinação de ião nitrato e ião sulfato no sal	55
7.3.	Análise de amostras de água salgada e de água de mar artificial pelo método de adição de padrão.....	59
7.3.1.	Estudo prévio das amostras de água salgada e de água de mar artificial	59
7.3.2.	Análise de amostras de água salgada	61
7.3.2.1.	Determinação das concentrações de iões	61
7.3.2.2.	Cálculo da incerteza expandida, U_y	62
7.3.2.3.	Compatibilidade dos resultados da composição iónica de água salgada antes e depois do tratamento	67
7.3.3.	Análise de água de mar artificial	68
7.3.4.	Controlo interno de qualidade	71
8.	Conclusões e perspectivas futuras.....	75
9.	Bibliografia e Webgrafia	77
Anexos.....		I
A1.	Teste de <i>Grubbs</i>	I
A2.	Repetibilidade e erro máximo de medições de massa e volume	II
A3.	Tabelas estatísticas	III
A4.	Exemplos de cromatogramas	VI

Índice de figuras

Figura 1: Diagrama com as percentagens e concentrações (m/m) dos iões mais abundantes nos sais marinhos.....	2
Figura 2: Diagrama representativo dos componentes de um sistema de IC.....	10
Figura 3: Representação de uma válvula de injeção na posição <i>LOAD</i> e na posição <i>INJECT</i>	11
Figura 4: Esquema do funcionamento de um supressor de membranas de troca catiónica com (a) regeneração química e (b) auto-regeneração.....	13
Figura 5: Gráfico geral representativo do método de adição de padrão.....	15
Figura 6: Diagrama de causa-efeito para a determinação da fracção mássica de um anião no sal analisado (ex. análise da composição de sal marinho).....	39
Figura 7: Curva de calibração com a média das áreas dos picos, para o ião nitrato.....	41
Figura 8: Gráfico do desvio padrão dos sinais vs. concentração (mg L^{-1}) para o ião nitrato.....	42
Figura 9: Gráfico representativo de uma curva de adição de padrão com 5 pontos equidistantes e tabela com as equações gerais para as diferenças entre concentração adicionada e média.....	43
Figura 10: Variação da incerteza padrão relativa com a concentração de ião nitrato na solução amostra diluída e com o número de medidas replicadas, p	45
Figura 11: Gráfico de representação de uma curva de adição de padrão, com 5 pontos.....	49
Figura 12: Variação da incerteza relativa expandida com a concentração de ião nitrato na solução amostra diluída e com o número de medidas replicadas, p	51
Figura 13: Ampliação do gráfico anterior (figura 12) na gama de incerteza relativa expandida mais baixa.....	51
Figura 14: Curvas de calibração, obtidas pelo método de adição de padrão, para o ião nitrato nas duas tomas de amostra.....	52
Figura 15: Curva de calibração, obtida pelo método de adição de padrão, para o ião nitrato e para a toma de branco.....	52

Figura 16: Curvas de calibração, obtidas pelo método de adição de padrão, para o ião sulfato e nas duas tomas de amostra.....	53
Figura 17: Representação gráfica da variabilidade esperada dos sinais da curva de adição de padrão utilizada na determinação de ião nitrato no amostra 36 A	60
Figura 18: Curva de calibração para a quantificação da concentração de ião nitrato na amostra 36 A, pelo método de adição de padrão	62
Figura 19: Diagrama de causa-efeito para a determinação da concentração de um ião específico numa amostra de água salgada	63
Figura 20: Curva de calibração para a determinação do ião nitrato na água de mar artificial pelo, método de adição de padrão	69
Figura 21: Exemplo de um cromatograma de uma mistura de aniões, obtido com uma coluna IonPac AS9 HC, segundo as condições descritas no ponto 6.4.2. para o cromatógrafo DX-500	VI
Figura 22: Exemplo de um cromatograma de uma mistura de aniões, obtido com uma coluna IonPac AS9 HC, segundo as condições descritas no ponto 6.4.2. para o cromatógrafo DX-300	VI

Índice de tabelas

Tabela 1: Metodologias de análise de aniões em soluções salinas e águas potáveis, por cromatografia iónica.....	4
Tabela 2: Estratégias de eliminação de matriz da amostra na análise de aniões, por cromatografia iónica.....	5
Tabela 3: Características das diferentes técnicas de detecção em IC.....	9
Tabela 4: Concentrações de iões na amostra de água de mar artificial.....	32
Tabela 5: Concentrações de iões na solução padrão mãe mista, utilizada na preparação de usados no estudo do desempenho quantitativo do cromatógrafo DX-500.....	34
Tabela 6: Concentrações de iões na solução padrão mãe mista, utilizada na preparação de padrões usados no estudo do desempenho quantitativo do cromatógrafo DX-300.....	34
Tabela 7: Volumes medidos (mL) na preparação das soluções utilizadas na análise da amostra 35.....	37
Tabela 8: Volumes medidos (mL) na preparação das soluções utilizadas na análise da amostra 36.....	37
Tabela 9: Volumes medidos (mL) na preparação das soluções utilizadas na análise da água de mar artificial	37
Tabela 10: Volumes medidos na preparação das soluções utilizadas na análise das amostras 35, 36 e água de mar artificial.....	38
Tabela 11: Áreas dos picos de nitrato obtidas para as 11 soluções padrão injectadas..	40
Tabela 12: Áreas dos picos de nitrato, excluindo valores aberrantes, obtidas para as 11 soluções padrão injectadas e respectivas médias, desvios padrão e parâmetros do teste de Fisher (4.2.1.)	41
Tabela 13: Valores da incerteza associada à concentração de nitrato na solução da amostra estimado por extrapolação.....	45
Tabela 14: Valores das incertezas relativas para as componentes da incerteza relativa final do exemplo apresentado.....	46

Tabela 15: Valor de concentração, coeficiente de expansão, incerteza expandida e incerteza padrão relativa para a solução padrão do íon nitrato.....	47
Tabela 16: Valores da incerteza relativa expandida associada à resposta instrumental (U'_{sxE}), de acordo com a concentração de íon nitrato e o número de medidas replicadas.....	50
Tabela 17: valores necessários para o cálculo da concentração final dos íons nitrato e sulfato no sal.....	54
Tabela 18: Valores utilizados para o cálculo de s'_{xE} para os íons nitrato e sulfato.....	55
Tabela 19: Massa de sal pesada (m_{pesada}) para a preparação das soluções para determinação dos íons nitrato e sulfato e respectiva u'_m	56
Tabela 20: Valores utilizados para o cálculo da u'_{Fdil} para os íons nitrato e sulfato.....	56
Tabela 21: Concentração inicial e correspondente incerteza expandida das soluções padrão dos íons nitrato e sulfato.....	57
Tabela 22: Volume de solução padrão medido e $u'_{\text{Fdil STD}}$ para os íons nitrato e sulfato	57
Tabela 23: Valores dos parâmetros necessários para a verificação da condição que permite desprezar a incerteza associada à adição de padrão à amostra.....	57
Tabela 24: Incertezas padrão relativas para o cálculo de u'_{fstd} , para as soluções padrão de íon nitrato e sulfato.....	58
Tabela 25: Incertezas relativas expandidas para os íons nitrato e sulfato.....	58
Tabela 26: Concentrações x_1 e x_2 (mg L^{-1}) de cada íon para as amostras de águas salgadas e de água de mar artificial	59
Tabela 27: Variabilidade esperada dos sinais na curva de adição de padrão utilizada na determinação de íon nitrato na amostra 36 A, considerando um nível de confiança de, aproximadamente, 95 %	60
Tabela 28: Valores de áreas dos picos obtidos para cada medida replicada das soluções utilizadas na caracterização da amostra 36 A pelo método de adição de padrão (A0, A1, A2, A3, A4)	61
Tabela 29: Concentrações estimadas (mg L^{-1}) para cada íon nas amostras de água salgada analisadas	62
Tabela 30: Valores de u'_{Fdil} , para cada íon, para todas as amostras.....	63

Tabela 31: Concentração inicial e correspondentes incertezas expandida e relativa das soluções padrão mãe dos iões analisados	64
Tabela 32: Volumes envolvidos na diluição da solução padrão mãe e $u'_{Fdil\ STD}$ para os iões analisados	64
Tabela 33: Valores dos parâmetros necessários verificar que a preparação das adições de padrão cumprem os pressupostos do modelo de regressão utilizado	65
Tabela 34: Incertezas padrão relativas utilizados no cálculo de u'_{fstd}	65
Tabela 35: Valores de s'_{xE} , para os iões analisados nas amostras de água salgada.....	66
Tabela 36: Incertezas padrão relativas combinadas, u'_C , e incertezas expandidas, U_C (mg L ⁻¹), para os iões analisados nas amostras de água salgada.....	66
Tabela 37: Concentrações e respectivas incertezas expandidas ($k=2$) dos iões analisados em cada amostra	66
Tabela 38: Parâmetros calculados para os testes de compatibilidade entre as concentrações de iões antes e depois do tratamento da água dos aquários números 35 e 36 do Aquário Vasco da Gama	67
Tabela 39: Valores das áreas dos picos obtidos para cada solução de água de mar artificial utilizadas na quantificação pelo método de adição de padrão	68
Tabela 40: Concentrações estimadas (mg L ⁻¹) para a análise da composição iónica da amostra de água de mar artificial analisada.....	69
Tabela 41: Valores de u'_{Fdil} , para cada ião, para a análise da água de mar artificial	70
Tabela 42: Incertezas padrão relativas utilizados no cálculo de u'_{fstd}	70
Tabela 43: Valores de s'_{xE} , para as concentrações estimadas de iões na solução diluída de água do mar artificial	70
Tabela 44: Incertezas padrão relativas combinadas, u'_C , e incertezas padrão expandidas, U_C (mg L ⁻¹), para as concentrações estimadas de iões na água de mar artificial	71
Tabela 45: Concentrações e respectivas incertezas padrão expandidas ($k=2$) dos iões analisados na amostra de água de mar artificial	71
Tabela 46: Valores do coeficiente de correlação linear de Pearson, r , estimados na análise das diversas amostras e valor de r máximo tabelado (r_{tab}) para um nível de confiança de 95 %	72

Tabela 47: Parâmetros para o teste de compatibilidade entre as medições replicadas das soluções das amostras 36 A e 35 A, obtidos em condições de repetibilidade	73
Tabela 48: Valores utilizados para o teste de compatibilidade entre as concentrações estimadas e esperadas de uma água de mar artificial	74
Tabela 49: Valores críticos de G para o teste bilateral de valores aberrantes únicos, para um nível de confiança de 95 %, para um teste bilateral	II
Tabela 50: Valores de repetibilidade e erros máximos de medições de massa e volume realizadas no decorrer do trabalho experimental. No caso das medições de volume, o erro máximo é estimado pela tolerância do valor nominal do volume	II
Tabela 51: Valores críticos da distribuição de t-Student	III
Tabela 52: Valores críticos de coeficiente de correlação linear de Pearson, para testes bilaterais	IV
Tabela 53: Valores críticos da distribuição de F de Fisher para um nível de confiança de 99,5 %	V

1. Introdução

A determinação de componentes vestigiais na presença de concentrações elevadas de possíveis interferentes é um problema comum em várias áreas da química analítica, como a análise da composição iónica de soluções aquosas. Contudo, a cromatografia permite a separação dos componentes iónicos da matriz, dos iões que se querem determinar. A separação torna-se mais difícil de alcançar quando as elevadas concentrações de iões de matriz eluem como picos de grandes dimensões que se podem sobrepôr ao pico do analito. Mesmo quando se recorre a um método de detecção selectivo em que os iões da matriz produzem sinais muito reduzidos ou até a ausência de sinal, estes iões podem continuar a exercer influência no cromatograma final ao alterar os tempos de retenção e a eficiência cromatográfica [1].

Na análise de matrizes salinas, as diferentes gamas de concentração das espécies maioritárias e minoritárias representam um desafio na optimização de uma metodologia para a determinação da sua composição [2]. Várias abordagens são apresentadas na literatura para analisar amostras de matrizes salinas e ultrapassar os efeitos indesejáveis da matriz. Algumas destas abordagens serão referidas no ponto 1.2.

1.1. Água do mar e amostras salinas

Há uma preocupação constante com a informação sobre os níveis de concentração de iões inorgânicos em água do mar, responsáveis por, ou relacionados com, problemas como a manutenção de um ambiente saudável, conservação ambiental e um melhor entendimento sobre a química do mar [3].

A oceanografia química, ciência que estuda a composição química dos oceanos, centra-se, principalmente, nos macronutrientes (azoto, fósforo e enxofre), uma vez que têm um papel importante no ecossistema marinho, especialmente para as plantas. No entanto, os micronutrientes também são alvo de investigação, já que, devido às suas baixas concentrações, podem não satisfazer as necessidades dos vários tipos de organismos marinhos [4]. Por exemplo, os níveis de iões nitrito e nitrato em águas com interesse ambiental, são determinantes para a avaliação da qualidade da água e estão também

associados ao seu nível trófico. Contudo, como os níveis destes iões em água do mar são geralmente baixos, é necessário um método sensível para a sua quantificação [5].

O controlo da qualidade da água em sistemas fechados, como em aquacultura ou aquarofilia, é especialmente crítico devido à rapidez com que se pode degradar.

A carga biológica dos aquários ultrapassa largamente aquela que se verifica no meio ambiente natural, provocando, a curto prazo, a deterioração da qualidade da água por falta de oxigénio e acumulação de substâncias tóxicas provenientes dos restos de alimentação e dos dejectos dos animais. Para melhorar a qualidade da água nos aquários, estes devem estar equipados com sistemas de filtração individuais adequados que facilitem a manutenção da qualidade da água [6]. Alguns sistemas de filtração baseiam-se na manutenção de meios naturais que contribuem para melhorar a qualidade da água, como a cultura de alguns tipos de macroalgas.

O controlo químico da água dos aquários passa pela determinação de alguns parâmetros físico-químicos tais como a temperatura, pH, oxigénio dissolvido, amónio, nitritos, nitratos, fosfatos, dureza, dióxido de carbono, salinidade, etc. O conhecimento dos níveis destes parâmetros permite controlar a qualidade da água de acordo com as exigências das diferentes espécies, controlar a eficiência dos sistemas de filtração e verificar o equilíbrio ou desequilíbrio do aquário [7].

Os principais aniões presentes na água do mar são o cloreto (Cl^-) e o sulfato (SO_4^{2-}) com cerca de 55 % e 8 % em massa, respectivamente. Os catiões mais abundantes são o sódio (Na^+) e o magnésio (Mg^{2+}) com cerca de 31 % e 4 %, respectivamente [4].

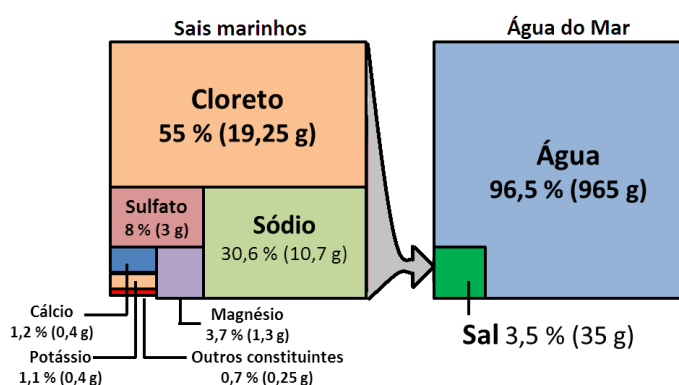


Figura 1: Diagrama com as percentagens e concentrações (m/m) dos iões mais abundantes nos sais marinhos (adaptado de [8]).

A água do mar é considerada uma amostra complexa, devido à sua elevada salinidade e disparidade entre gamas de concentração dos iões da matriz, que dificultam a sua análise directa [9].

A elevada salinidade deste tipo de amostras obriga, geralmente, a proceder à sua diluição, mas ao fazê-lo, as concentrações de alguns dos analitos podem ficar abaixo dos limites de detecção, restringindo a utilidade da diluição [10].

Vários métodos têm sido utilizados para determinar iões presentes em concentrações maioritárias e vestigiais em água do mar, como electroforese capilar (CE), cromatografia iónica (IC) e técnicas espectrofotométricas, assim como métodos electroquímicos. De todos os métodos, a cromatografia iónica continua a ser a mais usada devido à sua capacidade para separar e determinar um grande número de analitos num curto espaço de tempo, mantendo uma elevada sensibilidade [9].

As matrizes de água do mar são caracterizadas por um valor de salinidade de cerca de 35 ‰ (g de sais/kg de água do mar), enquanto outro tipo de soluções salinas podem apresentar variações na composição iónica [2].

Exemplos de outras amostras, nas quais existe uma grande diferença entre as concentrações dos componentes, são os sais alcalinos usados como padrões nacionais em análises elementares que apresentam elevada qualidade analítica. Estes sais/amostras salinas devem ser rigorosamente testados, passando por análises de controlo de qualidade, de forma a determinar e quantificar as impurezas presentes, geralmente em quantidades da ordem de $\mu\text{g g}^{-1}$, e verificar a pureza reportada [11].

1.2. Caracterização química de amostras salinas

As características que distinguem a água do mar de outras águas de origem natural, são a salinidade e as diferenças entre as concentrações dos iões presentes. Por exemplo, a concentração de ião cloreto em água do mar excede, consideravelmente, a concentração dos restantes aniões. O mesmo acontece em sais purificados, como cloreto de sódio. Enquanto a quantificação dos componentes iónicos maioritários, como o cloreto, não

representa um problema significativo, é de longe muito mais difícil determinar componentes em muito baixas concentrações. Sendo a água do mar uma amostra complexa, foi necessário o desenvolvimento de metodologias de análise multi-elementar capazes de fornecer informação sobre o conteúdo de constituintes iónicos vestigiais, além do conteúdo em constituintes maioritários. Os métodos de eleição para este tipo de análises são, cromatografia iónica e electroforese capilar [3].

Dentro da cromatografia iónica vários métodos já foram testados, consoante o equipamento disponível. Na tabela 1 estão sumariados alguns métodos de determinação de analitos em soluções salinas e águas potáveis, documentados em artigos publicados.

Tabela 1: Metodologias de análise de aniões em soluções salinas e águas potáveis, por cromatografia iónica.

Analito	Matriz	Coluna	Eluente	Deteção	Referência
F ⁻ ; Cl ⁻ ; NO ₂ ⁻ ; Br ⁻ NO ₃ ⁻ ; PO ₄ ³⁻ ; SO ₄ ²⁻	Água do mar	AS9-HC	Na ₂ CO ₃	Condutimétrica	[2]
NO ₃ ⁻ ; PO ₄ ³⁻	Água do mar	AS4A-SC	Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃	Condutimétrica e UV	[10]
ClO ₃ ⁻ ; SO ₄ ²⁻	NaCl	AS9-SC	Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃	Condutimétrica	[12]
ClO ₃ ⁻ ; BrO ₃ ⁻ ; IO ₃ ⁻	Água potável	IC-Pak Anion HR	NaHCO ₃	UV e MS	[13]
Cl ⁻ ; Br ⁻ ; F ⁻ ; NO ₃ ⁻ ; PO ₄ ³⁻ ; SO ₄ ²⁻	Água potável	Metrosep Anion Dual 2	Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃	Condutimétrica	[14]
Cl ⁻ ; Br ⁻ ; F ⁻ ; NO ₂ ⁻ ; BrO ₃ ⁻ ; NO ₃ ⁻ ; SO ₄ ²⁻	Águas ambientais	Hidróxido selectivas	Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃	Condutimétrica	[15]
NO ₃ ⁻ ; NO ₂ ⁻	Água do mar	AS10	HCl/NaCl; NaCl	UV	[16]
NO ₃ ⁻ ; NO ₂ ⁻	Matriz de cloreto	AS4A-SC	Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃ / NaCl	Condutimétrica e UV	[17]
NO ₃ ⁻ ; PO ₄ ³⁻	Água do mar	AS4A	Na ₂ CO ₃ /NaHCO ₃	Condutimétrica	[18]
F ⁻ ; Cl ⁻ ; NO ₂ ⁻ ; Br ⁻ ; NO ₃ ⁻ ; SO ₄ ²⁻	Água para consumo	Metrohm IC Anion Column Super Sep	Àc.ftálico/ acetoneitrilo	Condutimétrica	[19]

Apesar da cromatografia iónica ser o método mais usual para a determinação da composição aniónica de amostras de relevância ambiental, em casos de matrizes maioritariamente compostas por iões cloreto, a determinação de alguns aniões (nitrito, nitrato e brometo) é dificultada pela sobreposição do pico do ião cloreto. A interferência do cloreto pode ser reduzida por precipitação de cloreto de prata com acetato de prata ou óxido de prata, ou passando a amostra por uma coluna contendo uma resina de permuta catiónica de iões Ag^+ . Contudo, estes métodos podem resultar no entupimento da coluna com cloreto de prata e na co-precipitação dos aniões de interesse [17].

Outro método para ultrapassar o problema de matriz pode ser o recurso à eliminação de matriz *on-column*. Esta técnica envolve a conversão da coluna de separação a uma forma iónica mais apropriada usando um eluente que contenha o ião interferente, e uma boa separação pode ser conseguida desde que a composição do eluente seja optimizada. Este método traz o benefício de não haver influências adicionais do ião interferente nos parâmetros de separação, como nos tempos de retenção e nas áreas de pico observadas [17].

Na cromatografia iónica multi-dimensional, são utilizadas mais do que uma coluna de separação, por comutação de colunas. Nesta opção, fracções da fase móvel são selectivamente transferidas de uma coluna para a outra. A redução da altura dos picos interferentes relativamente à altura dos picos dos analitos é conseguida pela selecção do tamanho/dimensão da fracção de amostra a ser transferida [20].

Na tabela 2 são apresentadas algumas estratégias de eliminação de matriz de amostras para análise por cromatografia iónica.

Tabela 2: Estratégias de eliminação de matriz da amostra na análise de aniões, por cromatografia iónica.

Analito	Matriz	Estratégia	Deteção	Referência
IO_3^- ; BrO_3^- ; NO_2^- ; Br^- ; NO_3^-	Matriz de cloreto	Eluente NaCl/tampão fosfato	UV	[1]
NO_2^- ; NO_3^-	Água do mar	IC multi-dimensional (colunas sílica revestidas com CTA^+); eluente NaCl	UV	[5]
Br^- ; NO_3^- ; NO_2^-	Água do mar	Colunas sílica revestidas com CTA^+ ; eluente NaCl	UV	[9]

BrO_3^-	Água do mar	IC multi-dimensional	Condutimétrica	[21]
Ác. Mono-; di-; tricloroacético	Água de consumo	Ag_2O para eliminar Cl^- ; BaOH para eliminar SO_4^{2-}	UV	[22]
Br^-	Água do mar	EIC; colunas de sílica revestidas com surfactantes	Condutimétrica e UV	[23]
F^-	Sais marinhos, sais fluoretados	HPIC; eluente NaCl	Condutimétrica	[24]
Br^-	Água do mar	IC capilar; colunas sílica revestidas CTA^+ ; eluente NaCl/CTA^+	UV	[25]
Cl^- ; NO_3^- ; PO_4^{3-} ; SO_4^{2-}	Água do mar	IC multi-dimensional (<i>column-switching</i>)	Condutimétrica	[26]

CTA^+ - ião cetiltrimetilamónio;

EIC - cromatografia iónica electrostática;

HPIC - cromatografia iónica de alta resolução.

2. Método analítico utilizado

2.1. Cromatografia – Fundamentos [27]

Através da cromatografia é possível separar, isolar e identificar compostos do mesmo tipo, numa mistura complexa. Todos os métodos cromatográficos são constituídos por uma fase estacionária e uma fase móvel. Os constituintes da amostra são transportados pela fase móvel através da fase estacionária. A separação cromatográfica é baseada nas diferenças dos tempos de retenção entre os componentes da amostra. Os componentes que apresentam maior afinidade para a fase estacionária movem-se mais lentamente ao longo da coluna cromatográfica. Os componentes eluem em bandas que são observadas, no final da separação, como picos de sinal do sistema de detecção.

Os analitos devem ser solúveis na fase móvel e capazes de interagir com a fase estacionária, seja por dissolução, absorção ou reacção química.

Num cromatograma, a posição dos picos permite-nos identificar os componentes da amostra, e a área dos picos está relacionada com a concentração dos respectivos compostos.

A eficácia da separação cromatográfica de dois solutos depende, em parte, da velocidade a que as duas espécies eluem. Esta velocidade pode ser medida através do tempo de retenção (t_R):

$$t_R = t_S + t_M \quad (1)$$

que representa o tempo necessário para que o analito chegue ao detector após a injeção da amostra. O tempo morto (t_M) indica a velocidade média de eluição da fase móvel. Todos os analitos passam, pelo menos, um tempo t_M na fase móvel. t_S corresponde ao tempo que o analito fica retido na fase estacionária. Este último parâmetro pode também ser chamado tempo de retenção ajustado ($t_R - t_M$) ao qual se atribui o símbolo t_R' .

O factor de retenção, k_R , é usado para comparar as velocidades de eluição dos solutos numa coluna. Para uma determinada combinação de fase móvel e fase estacionária, o factor de retenção é sempre o mesmo para um determinado soluto.

$$k_R = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (2)$$

Idealmente, as separações deveriam ser realizadas sob condições em que o factor de retenção de cada soluto se situe entre 1 e 10.

O factor de selectividade, α_s , de uma coluna para dois solutos, A e B, é definido como:

$$\alpha_s = \frac{k_B}{k_A} \quad (3)$$

e corresponde à distância entre o máximo do pico correspondente ao soluto A e o máximo do pico adjacente, correspondente ao soluto B. Se o valor de α_s for superior a 1, há separação dos picos, se for inferior, os picos estão co-eluídos.

Dois parâmetros são utilizados para avaliar a eficiência cromatográfica da coluna, o número de pratos teóricos (N) e a altura equivalente de um prato teórico (H):

$$N = \frac{L}{H} \quad (4)$$

em que, L é o comprimento da coluna.

O termo “pratos teóricos” e “altura do prato” surge com a teoria de Martin e Synge, chamada Teoria dos Pratos Teóricos, em que a coluna cromatográfica é vista como uma coluna de destilação, onde em cada prato teórico ocorre o equilíbrio entre a fase estacionária e a fase móvel.

Considerando que um pico cromatográfico representa um sinal instrumental com uma distribuição aproximadamente Gaussiana, N pode ser estimado, a partir da informação retirada do cromatograma, por:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (5) \quad \text{ou} \quad N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (6)$$

em que W representa a largura da base do pico e $W_{1/2}$ é a largura a meia altura do pico. A equação 6 é utilizada, principalmente, nos casos em que o pico é assimétrico.

A resolução (R_s) dá-nos uma medida quantitativa da capacidade de uma coluna separar dois analitos (A e B):

$$R_s = \frac{2(t_{RB} - t_{RA})}{W_A + W_B} = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha_s - 1}{\alpha_s} \right) \left(\frac{k_B}{1 + k_B} \right) \quad (7)$$

Uma resolução de 1,5 indica a separação praticamente completa de dois analitos.

2.2. Cromatografia iónica

Existem registos do uso de cromatografia iónica (IC) desde 1917, contudo, o maior avanço em IC e, conseqüentemente, a sua implementação como método analítico, deu-se em 1975 por Hamish Small *et al.* com a introdução da supressão da condutividade do eluente que diferenciou esta técnica de separação de outras cromatografias líquidas. A IC permite uma análise rápida e sensível na determinação simultânea de iões [28].

Desde a sua implementação, tornou-se um método analítico de rotina na área ambiental, para determinação de iões inorgânicos, especialmente aniões. Esta técnica tem sido alvo de vários estudos relacionados com o tratamento das amostras, separação, detecção, etc., para a melhoria da análise [29].

A cromatografia iónica inclui uma variedade de modos de separação, tais como troca/permuta iónica, exclusão, paridade iónica ou cromatografia iónica de quelação, sendo a cromatografia de troca iónica a mais recorrente [30].

Para análises de rotina o detector mais usado continua a ser o condutimétrico, mas novas aplicações requeriam o desenvolvimento de técnicas de detecção diferentes que pudessem providenciar o aumento de sensibilidade, informação acerca da identidade, estrutura ou composição elementar dos analitos (tabela 3), como a detecção por absorção UV, amperométrica, potenciométrica e por espectrometria de massa (MS) [30].

Tabela 3: Características das diferentes técnicas de detecção em IC [30].

	Condutividade com Supressão	UV-vis	Amperometria	Potenciometria	Espectrometria de Massa
Baixo LD	xx	xx	xxx	xx	xxx
Gama linear	xx	xx	x	xxx	xx
Selectividade	-	x	-	xxx	xxx
Universal	xxx	-	-	-	xx
Informação estrutural	-	x	-	-	xxx
Robustez	xxx	xxx	-	x	x
Simplicidade	xxx	xxx	-	x	-
Baixo custo	xx	xx	xx	xxx	-

Fraco (-); Moderado (x); Bom (xx); Muito bom (xxx)

Apesar de ser aplicável a uma vasta gama de compostos, a análise simultânea de aniões inorgânicos (fluoreto, cloreto, nitrito, brometo, nitrato, fosfato e sulfato) continua a ser a principal aplicação desta técnica, geralmente por detecção condutimétrica com supressão. Este método de detecção permite o uso de eluentes com elevada força iónica, obtendo-se maiores variações na selectividade comparativamente com a detecção condutimétrica sem supressão [31].

Alguns autores demonstraram que não é absolutamente necessário o uso de supressor para a realização de cromatografia iónica de alta resolução. Recorrendo a uma troca iónica de baixa capacidade com eluente de baixa condutividade, a condutividade de fundo é suficientemente baixa para permitir que a separação de aniões seja detectada com um detector condutimétrico simples [19].

Os parâmetros mais comuns que determinam a separação de aniões inorgânicos são a força iónica e o pH do eluente. O tempo de retenção, para todos os iões, é afectado pela força iónica, enquanto o pH afecta, maioritariamente, os tempos de retenção de ácidos fracos como o fosfato [18].

2.2.1. Equipamento

O sistema de IC é constituído, essencialmente, por um eluente (sistema isocrático), uma bomba, um injector ou válvula de injeção, uma pré-coluna, uma coluna analítica, um supressor (opcional), um detector e um sistema de recolha de dados.

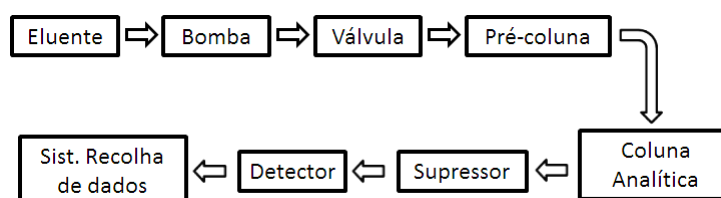


Figura 2: Diagrama representativo dos componentes de um sistema de IC.

A função do eluente é competir com os iões da amostra pelos iões da fase estacionária (locais activos) e separar/eluir os iões da amostra, num espaço de tempo razoável, em bandas bem definidas. Assim, o principal componente do eluente é o ião de competição. Ao escolher o eluente deve-se ter em atenção alguns factores para não afectar as características da eluição dos iões da amostra, nomeadamente a compatibilidade com o modo de detecção, o pH e a natureza e concentração do ião de competição [32].

A bomba impulsiona o eluente pelo sistema, a um fluxo preciso e controlado. O tipo de bomba depende do eluente. Se se trabalhar com composição constante a bomba usada será isocrática. A qualidade de uma bomba é avaliada pela estabilidade e precisão do fluxo produzido [33].

Na válvula de injeção, ou injector, é inserido um *loop*, escolhido de acordo com o volume de injeção pretendido, que fixando o volume de amostra injectado, permite eliminar o erro do operador [33]. A válvula funciona em duas posições: *LOAD*, em que o eluente flui pela válvula de injeção, sem passar pelo *loop*, enquanto a amostra é introduzida neste; e a posição *INJECT*, em que o eluente é bombeado para o *loop* arrastando a amostra para a coluna analítica [34], como representado na figura 3.

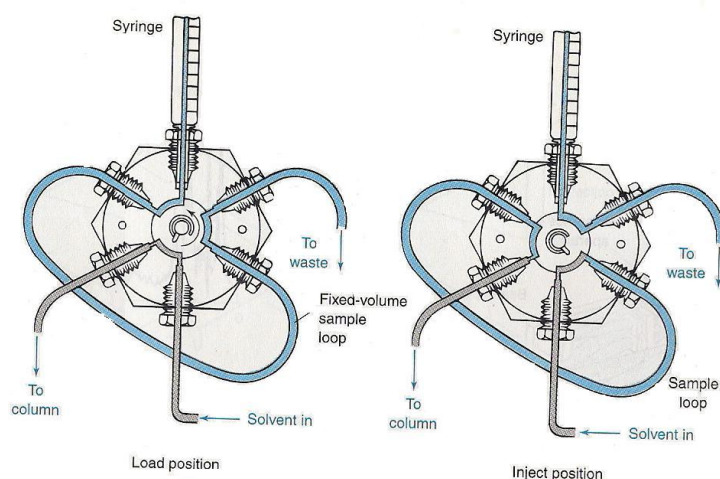
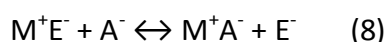


Figura 3: Representação de uma válvula de injeção na posição *LOAD* e na posição *INJECT* [33].

É normal usar-se uma pré-coluna para prevenir a contaminação da coluna analítica. Ao reter eventuais contaminantes orgânicos e pequenas partículas, permite aumentar o tempo de vida da coluna analítica. O seu revestimento é o mesmo que o da coluna para não interferir na análise [35].

As colunas analíticas para IC, são, geralmente, constituídas por uma resina insolúvel (matriz) que contém iões fixos de carga contrária aos iões analito. Os iões do eluente actuam como contra-íões, iões de carga contrária aos da coluna que, durante a análise, serão substituídos pelos iões a analisar. Durante a separação cromatográfica dos analitos ocorrem sucessivos equilíbrios entre os iões fixos na fase estacionária e os iões da amostra [32].

Por exemplo, numa troca aniónica, os iões fixos na coluna têm carga positiva, M^+ , e os contra-íões têm carga negativa, E^- . Quando a amostra com iões negativos, A^- , passa na coluna, ocorre a troca representada em 8 [32]:



O supressor (fig. 4) é usado para minimizar a condutividade do eluente e converter as espécies iónicas da amostra numa única forma iónica, aumentando a sensibilidade da detecção. O uso do supressor aumenta a razão sinal/ruído por comparação com a detecção por condutividade sem supressão [35].

A detecção condutimétrica usando como eluente, por exemplo, o tampão de hidrogenocarbonato/carbonato, é melhorada quando se trocam os catiões do eluente por iões hidrogénio, antes da determinação. Os iões bicarbonato e carbonato são convertidos em ácido carbónico, que possui uma baixa condutividade. A condutividade de fundo do eluente é, assim, suprimida. Para ilustrar as reacções que ocorrem no supressor, consideremos como ião analito o Cl^- , e um eluente composto por hidrogenocarbonato de sódio:



A equação 9 diz respeito à reacção do eluente no supressor, a equação 10 à reacção do ião analito.

O resultado deste processo é a diminuição da condutividade do eluente, e o aumento da condutividade da amostra devido à substituição dos iões Na^+ ($\lambda_+ = 50 \text{ S cm}^2 \text{ equiv}^{-1}$) por iões H^+ ($\lambda_+ = 350 \text{ S cm}^2 \text{ equiv}^{-1}$) [36].

Para a troca catiónica o procedimento é semelhante, mas o supressor contém uma coluna/membrana de troca aniónica na forma OH^- , fazendo a troca dos aniões do eluente e do analito por iões OH^- [36].

No final deste processo, os supressores são regenerados, através da passagem de uma solução regenerante, para recuperarem a sua forma ácida ou básica consoante se trate de análise de aniões ou catiões, respectivamente (figura 4).

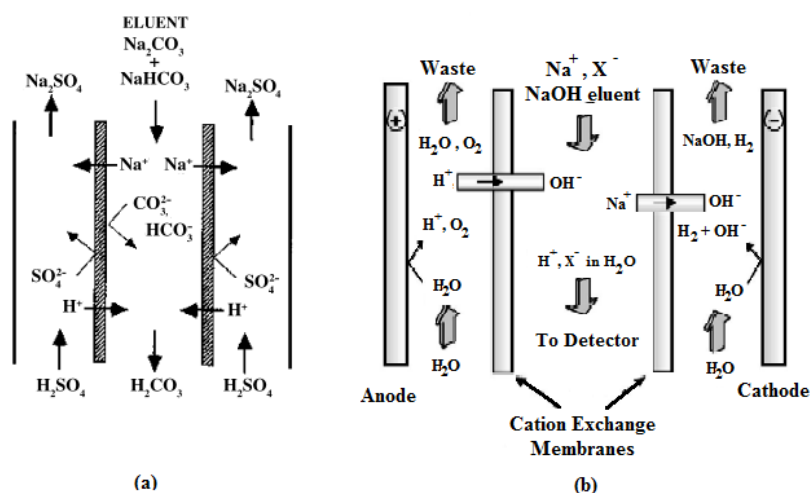


Figura 4: Esquema do funcionamento de um supressor de membranas de troca catiónica com (a) regeneração química e (b) auto-regeneração [36].

Existem vários tipos de detecção que podem ser usados em análises por IC, mas a mais comum é a condutimétrica. Na detecção condutimétrica, é medida a condutância, G , da solução. A condutância medida é corrigida pela constante da célula, K , para produzir a condutância que seria medida numa célula com eléctrodos de 1 cm^2 de área e afastados entre si de 1 cm . O resultado desta correcção é a condutividade, κ , dada em S cm^{-1} [37].

$$\kappa = K \times G \quad (11)$$

2.3. Calibração analítica

A calibração é a “operação que (...), estabelece a relação entre os valores de grandeza com incertezas de medição provenientes de padrões e as indicações correspondentes com incertezas de medição associadas (...)” sob determinadas condições [38]. Normalmente, expressa através de uma função/equação que representa o perfil de distribuição do sinal medido com a concentração de analito, permitindo a determinação quantitativa.

A calibração analítica é efectuada recorrendo a padrões químicos (e/ou materiais de referência). O tipo de calibração (curva de calibração, adição de padrão, padrão interno, etc.) deve ser escolhido de forma adequada para o tipo de amostras e métodos de análise.

A decisão da periodicidade da calibração analítica depende da variação de factores relacionados com o método como a sensibilidade/estabilidade e repetibilidade.

O método de adição de padrão permite determinar concentrações de analito em amostras de matriz desconhecida, eliminando efeitos de matriz, ao adicionar quantidades conhecidas do analito à amostra.

2.3.1. Método de Adição de Padrão

A adição de padrão aplica-se quando a matriz da amostra afecta a sensibilidade da medição, quando a simulação da matriz é difícil ou necessita de muito tempo. As soluções para análise, são preparadas adicionando diferentes volumes, $V_{z,i}$, de uma solução padrão, z , a um volume, V_x , ou a uma massa, m_x , da amostra, x , de concentração desconhecida. Após diluição até ao mesmo volume, V , cada solução é analisada [39].

O sinal medido, A , é traçado, graficamente, contra a concentração de analito adicionada. A concentração de analito na amostra é dada directamente pelo valor absoluto da intercepção da linha de regressão no eixo dos xx . Assim, a adição de padrão só é aplicável se os sinais medidos para todas as soluções se situarem na gama linear de trabalho do instrumento/método experimental.

Tendo em conta a etapa de diluição, a concentração de analito, θ_x , na amostra líquida ou a fracção mássica, w_x , do analito na amostra sólida é normalmente calculada a partir das equações 12 e 13 (b_0 : intercepção no eixo yy, b_1 : declive, A_i : sinal medido para a adição i) [39]:

$$A_i = b_1 \times \frac{V_{z,i} \times \beta_z}{V} + b_0 \quad (12)$$

$$\beta_x = \frac{b_0}{b_1} \times \frac{V}{V_x} \text{ ou } w_x = \frac{b_0}{b_1} \times \frac{V}{m_x} \quad (13)$$

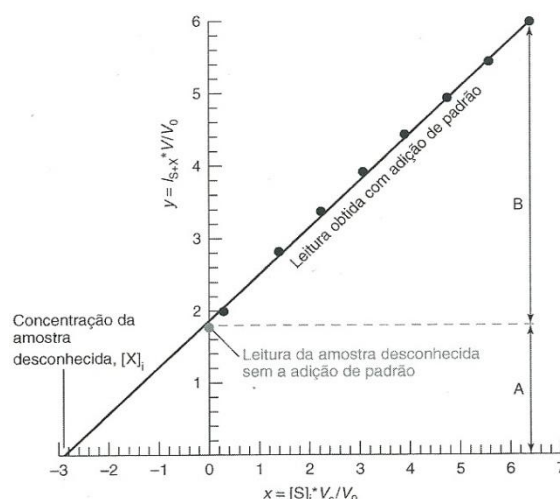


Figura 5: Gráfico geral representativo do método de adição de padrão [33].

Apesar de ser a melhor abordagem para o problema de interferências de matriz, este método tem algumas desvantagens. A principal é que cada amostra necessita de uma calibração específica, em contraste com as calibrações convencionais que podem fornecer os valores de concentração para várias amostras. No método de adição de padrão são necessárias maiores quantidades de amostra do que noutros métodos. Em termos estatísticos trata-se de um método de extrapolação, menos preciso do que os métodos de interpolação [40].

3. Validação do procedimento de medição

Para validar ou avaliar a adequação de um método para a análise em causa há vários parâmetros de desempenho analítico que devem ser avaliados, entre os quais a selectividade, gama de trabalho/linearidade, limites de detecção e quantificação, precisão, exactidão e/ou veracidade e incerteza. A avaliação da incerteza será descrita no ponto 4.

3.1. Parâmetros de desempenho do método experimental

3.1.1. Selectividade

A selectividade de um método experimental é a sua capacidade de identificar e distinguir um determinado analito numa mistura complexa, sem interferência de outras espécies. Se a selectividade não for assegurada, a linearidade, a exactidão e a precisão estarão comprometidas [41].

3.1.2. Gama de trabalho/Linearidade

A gama de trabalho de um método indica o intervalo de concentrações de analito, em que é possível aplicar o método com precisão e exactidão. Se na gama de trabalho utilizada, o método gerar uma resposta directamente proporcional à concentração de analito, então há linearidade na gama de trabalho. Esta linearidade pode ser avaliada através do teste de ajuste do modelo linear à resposta do método [42].

3.1.3. Limite de detecção e limite de quantificação

O limite de detecção (LD) é o menor sinal de analito passível de ser distinguido do sinal do branco, com um certo nível de confiança (normalmente 95 %), utilizando um determinado procedimento experimental [42]. Pode ser calculado através da equação 14:

$$LD = 3,3 \times \frac{s}{b} \quad (14)$$

onde s é a estimativa do desvio padrão da resposta, que pode ser a estimativa do desvio padrão da equação da linha de regressão, e b o declive ou coeficiente angular da curva analítica. O factor 3,3 é baseado em observações estatísticas com, relativamente, poucos graus de liberdade (< 6), para um nível de confiança de 99,7 % [42].

O limite de quantificação (LQ) é a menor concentração de analito que pode ser quantificada com um certo nível de confiança, utilizando um determinado procedimento experimental [42]. O seu valor pode ser calculado através da equação 15 [41]:

$$LQ = 10 \times \frac{s}{b} \quad (15)$$

Neste caso, assume-se um factor de 10, para assegurar um coeficiente de variação nas determinações de 10 % [42].

3.1.4. Precisão da medição

A precisão é definida como a “aproximação entre indicações ou valores medidos obtidos por medições repetidas no mesmo objecto ou objectos semelhantes em condições especificadas”, e é geralmente expressa na forma numérica por desvio-padrão, variância ou coeficiente de variação [38]. A precisão da medição é usada para definir: repetibilidade, precisão intermédia e reprodutibilidade da medição.

A repetibilidade representa “a fidelidade de medição para um conjunto de condições de repetibilidade”, que inclui “o mesmo procedimento de medição, os mesmos operadores, o mesmo sistema de medição, as mesmas condições operativas, a mesma localização, e medições repetidas no mesmo objecto ou objectos similares, num curto intervalo de tempo” [38].

A precisão intermédia de medição representa a “fidelidade de medição para um conjunto de condições de fidelidade intermédia”. Estas condições incluem “o mesmo procedimento de medição, o mesmo local e medições repetidas no mesmo objecto ou objectos similares, durante um intervalo de tempo alargado, mas que pode incluir outras condições que se fazem variar, como novas calibrações, padrões, operadores, sistemas de medição” [38]. Este parâmetro é reconhecido como o mais representativo da variabilidade dos resultados num laboratório [41].

Condições de reprodutibilidade incluem “diferentes locais, operadores e sistemas de medição, incluindo procedimentos de medição, e medições repetidas no mesmo objecto ou objectos similares”, sendo a reprodutibilidade a “*fidelidade de medição*” para um conjunto de condições como as descritas [38]. Este parâmetro evidencia a variabilidade obtida quando diferentes laboratórios analisam a mesma amostra [42].

3.1.5. Exactidão e Veracidade da medição

Segundo o VIM, a exactidão é “a aproximação entre um valor medido e um valor verdadeiro de uma mensuranda”, e a veracidade é definida como a “aproximação entre a média de um número infinito de valores medidos repetidos e um valor de referência” [38].

Os processos mais utilizados para avaliar a exactidão de um método são a utilização de materiais de referência, a comparação de métodos e a realização de ensaios de recuperação [42].

4. Incerteza de medição

A incerteza de medição é definida no Vocabolário Internacional de Metrologia [38] como um “parâmetro não negativo que caracteriza a dispersão dos valores da grandeza que são atribuídos à mensuranda a partir das informações usadas”.

A incerteza da medição inclui componentes provenientes de efeitos sistemáticos e aleatórios. Os efeitos sistemáticos associados, por exemplo, a correcções de valores atribuídos a padrões, por vezes não são corrigidos mas incorporados como componentes da incerteza. Os efeitos provenientes de factores aleatórios podem ser estimados por uma avaliação de tipo A, isto é, a partir da distribuição estatística dos valores da grandeza, em séries de medições e podem ser caracterizados por desvios-padrão. Tanto os efeitos sistemáticos, como os aleatórios, podem ser estimados por uma avaliação de tipo B, através de funções de densidade de probabilidade baseadas na experiência ou outras informações [38].

As três abordagens mais utilizadas na quantificação da incerteza de medição são: a abordagem subanalítica, “passo a passo” ou “bottom-up”; a abordagem supralaboratorial ou baseada em informação interlaboratorial; a abordagem supra-analítica ou baseada em dados de validação e/ou controlo da qualidade do método analítico recolhidos em ambiente intralaboratorial [43].

4.1. Abordagem Subanalítica ou “Passo a Passo”

A abordagem subanalítica baseia-se na identificação, quantificação e combinação de todas as fontes de incerteza responsáveis pelos efeitos sistemáticos e aleatórios isolados, que afectam a qualidade da medição.

A avaliação da incerteza envolve as seguintes etapas [43, 45]:

- i) Especificação da mensuranda e do procedimento de medição;
- ii) Identificação das fontes de incerteza;
- iii) Quantificação das componentes de incerteza;
- iv) Cálculo da incerteza combinada ($u_c(x)$);
- v) Cálculo da incerteza expandida (U_c).

Esta abordagem permite estimar a contribuição de cada fonte de incerteza identificada para a incerteza da medição calculada, que pode ser usada para otimizar o método analítico do ponto de vista metrológico.

4.1.1. Especificação da mensuranda e do procedimento de medição

Segundo o VIM, a mensuranda é a grandeza que se pretende medir. Definir a mensuranda implica a descrição do estado do fenómeno, corpo ou substância de que a grandeza é uma propriedade, incluindo qualquer componente relevante e as entidades químicas envolvidas. A medição, incluindo o sistema de medição e as condições nas quais a medição é efectuada, pode alterar o fenómeno, corpo ou substância, e como tal, este também deve ser bem definido [38].

4.1.2. Identificação das fontes de incerteza

Para a identificação das fontes de incerteza, é importante analisar na íntegra o procedimento de medição, bem como os requisitos para o resultado da análise a efectuar, e por isso, este passo apresenta alguma complexidade.

Para uma melhor percepção de todas as fontes que influenciam a incerteza final, deve-se proceder à construção de um diagrama de causa/efeito, também conhecido como diagrama de Ishikawa ou “espinha de peixe”.

4.1.3. Quantificação das componentes de incerteza

Nas medições em Química, etapas analíticas como a pesagem, medição de volumes, diluições e quantificação experimental estão quase sempre presentes. De seguida descreve-se a quantificação das incertezas associadas a estas etapas.

4.1.3.1. Incerteza associada a uma pesagem

A incerteza associada a uma pesagem unitária, u_m , pode ser estimada pela combinação linear das seguintes componentes:

- 1) Incerteza associada à calibração da balança, $u_{\text{Bal}}^{\text{Cal}}$;
- 2) Incerteza associada à repetibilidade da balança, $u_{\text{Bal}}^{\text{Rep}}$.

$$u_m = \sqrt{(u_{\text{Bal}}^{\text{Cal}})^2 + (u_{\text{Bal}}^{\text{Rep}})^2} \quad (16)$$

Para uma pesagem por diferença, $u_m [m = (\text{massa bruta}) - (\text{massa da tara})]$, as incertezas referidas anteriormente são contabilizadas duas vezes porque as duas medições de massa são independentes em termos de repetibilidade da pesagem e de linearidade da resposta da balança [44].

$$u_m = \sqrt{2(u_{\text{Bal}}^{\text{Cal}})^2 + 2(u_{\text{Bal}}^{\text{Rep}})^2} \quad (17)$$

4.1.3.2. Incerteza associada a uma medição de volume

A incerteza associada a uma medição de volume, u_v , resulta da combinação de três componentes:

- 1) Incerteza associada à calibração do material volumétrico, u_v^{Cal} ;
- 2) Incerteza associada à repetibilidade da manipulação do material volumétrico, u_v^{Rep} ;
- 3) Incerteza associada ao efeito da temperatura, u_v^{Temp} , se esta não for controlada.

A incerteza associada à calibração de material volumétrico convencional é estimada através da tolerância associada ao valor nominal do seu volume, fornecida pelo fabricante. Normalmente, a tolerância é fornecida sem o nível de confiança e sem qualquer indicação da

distribuição que lhe está associada. Nestes casos considera-se que este volume segue uma distribuição rectangular uniforme [44].

$$u_V^{\text{Cal}} = \frac{\text{Tolerância do material}}{\sqrt{3}} \quad (18)$$

Pode-se considerar uma distribuição triangular para a tolerância associada ao valor nominal de uma pipeta, porque expressa uma maior probabilidade do volume do material estar próximo do valor nominal. Neste caso, o denominador da equação anterior deve ser substituído por $\sqrt{6}$ [44].

A incerteza associada à repetibilidade do material volumétrico é estimada pelo desvio padrão de medições de volume sucessivas, que é equivalente ao desvio padrão das massas de água medidas com o material volumétrico, assumindo que a densidade da água à temperatura ambiente é aproximadamente igual a 1 [44].

A incerteza associada ao efeito da temperatura reflecte o impacto da variação da temperatura do laboratório na medição. Esta variação pode ter uma distribuição normal (equação 19) ou uma distribuição rectangular (equação 20) [44].

$$u_V^{\text{Temp}} = \frac{V \times \Delta T \times \alpha}{1,96} \quad (19) \quad \text{ou} \quad u_V^{\text{Temp}} = \frac{V \times \Delta T \times \alpha}{\sqrt{3}} \quad (20)$$

O termo α representa o coeficiente de expansão volúmica do líquido ou solvente à temperatura de referência, normalmente 20 °C. Na prática, quando são utilizadas soluções aquosas diluídas, poderá ser utilizado o coeficiente de expansão volúmica α da água: $2,7 \times 10^{-4} \text{ } ^\circ\text{C}^{-1}$.

Habitualmente, quando a temperatura varia num intervalo de $\pm 4 \text{ } ^\circ\text{C}$ em relação à temperatura de referência ou quando se efectua uma diluição através de duas medições de volumes imediatamente sucessivas considera-se que esta componente de incerteza é desprezável [44].

Quando é considerado o efeito da temperatura, isto é, quando a temperatura do laboratório sofre variações superiores a 4 °C em relação ao valor de referência, a incerteza padrão, u_V , associada ao volume, V , medido com o material volumétrico é calculada através da equação 21 [44]:

$$u_V = \sqrt{(u_V^{\text{Cal}})^2 + (u_V^{\text{Rep}})^2 + (u_V^{\text{Temp}})^2} \quad (21)$$

4.1.3.3. Incerteza associada a volumetrias sucessivas

Considerando uma diluição de um volume inicial, V_i , para um volume final, V_f , a incerteza, u_{FV} , associada à solução diluída é calculada pela relação 22 [45]:

$$\frac{u_{FV}}{F_V} = \sqrt{\left(\frac{u_{V_i}}{V_i}\right)^2 + \left(\frac{u_{V_f}}{V_f}\right)^2} = \sqrt{\frac{(u_{V_i}^{\text{Cal}})^2 + (u_{V_i}^{\text{Rep}})^2}{V_i^2} + \frac{(u_{V_f}^{\text{Cal}})^2 + (u_{V_f}^{\text{Rep}})^2}{V_f^2}} \quad (22)$$

em que as componentes de incerteza associadas a V_i e V_f são estimadas de acordo com a equação 21, não considerando a componente temperatura, u_V^{Temp} .

4.1.3.4. Incerteza associada a resultados obtidos por métodos instrumentais de análise

A incerteza associada a resultados obtidos recorrendo a instrumentação analítica resulta da combinação das seguintes fontes de incerteza [45]:

- 1) Incerteza associada à interpolação do sinal da amostra na curva de calibração (u_{inter});
- 2) Incerteza associada à definição das referências (ex: padrões químicos) usados na calibração do método instrumental de análise (u_E).

Normalmente, os métodos instrumentais de análise são usados em gamas de concentração onde a resposta instrumental é, aproximadamente, proporcional à quantidade de analito. Nestes casos, muitas vezes, recorre-se ao método de regressão paramétrico linear não ponderado, mais conhecido por “método dos mínimos quadrados”, para descrever a resposta instrumental.

Se os pressupostos do modelo forem válidos, ou seja, se a resposta for homoscedástica e linear e se a incerteza associada ao teor relativo dos padrões de calibração for significativamente inferior à precisão da resposta instrumental, pode usar-se o modelo de regressão para estimar grande parte da incerteza associada a esta etapa analítica [44].

A incerteza de interpolação combina as incertezas associadas à calibração da instrumentação e à repetibilidade da leitura do sinal da amostra [44].

Considerando que a curva de calibração é descrita de forma adequada pelo modelo de regressão “método dos mínimos quadrados” [44] tem-se:

$$u_{\text{inter}} = \frac{s_{y/x}}{b} \times \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{1}{M} + \frac{(\bar{y}_a - \bar{y})^2}{b^2 \times \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (23)$$

em que:

$s_{y/x}$ – desvio padrão residual da curva de calibração;

b – declive da curva de calibração;

n – número de leituras de padrões utilizados no traçado da curva de calibração

M – número de leituras utilizadas para determinar o teor da amostra;

\bar{y}_a – valor médio das n leituras da amostra;

\bar{y} - valor médio das N leituras dos padrões de calibração;

x_i – concentração de cada um (i) dos n padrões de calibração;

\bar{x} – valor médio das concentrações dos padrões de calibração.

Quando o teor da amostra é quantificado por extrapolação de uma curva de calibração descrita pelo modelo de regressão anteriormente referido, a incerteza resulta dos desvios associados à linha de regressão e ao processo de extrapolação [46]:

$$u_{\text{extra}} = \frac{s_{y/x}}{b} \times \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{y}^2}{b^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (24)$$

A equação 25 representa a combinação da incerteza associada à interpolação com a incerteza associada à preparação dos padrões de calibração (u_E):

$$u(c_{\text{inter}}) = c_{\text{inter}} \times \sqrt{\left(\frac{u_{\text{inter}}}{c_{\text{inter}}}\right)^2 + \left(\frac{u_E}{c_E}\right)^2} \quad (25)$$

em que c_{inter} representa a concentração da amostra estimada por interpolação e u_E/c_E a incerteza padrão relativa associada à concentração dos padrões de calibração (habitualmente considera-se o padrão menos concentrado da curva de calibração para o cálculo da razão). No caso da incerteza associada à extrapolação, a combinação das incertezas faz-se de forma semelhante.

4.1.4. Cálculo da incerteza combinada e incerteza expandida

Frequentemente são descritos dois casos específicos da combinação de incertezas padrão, de acordo com a lei geral de propagação de incertezas de componentes independentes, uma para somas ou diferenças, ex: $y=(p+q+r+\dots)$ (equação 26),

$$u_c(y) = \sqrt{u(p)^2 + u(q)^2 + \dots} \quad (26)$$

e outra para modelos que envolvam produtos ou quocientes, ex: $y=(p \times q \times r \times \dots)$ ou $y = \frac{p}{(q \times r \times \dots)}$ (equação 27),

$$u_c(y) = \sqrt{\left(\frac{u(p)}{p}\right)^2 + \left(\frac{u(q)}{q}\right)^2 + \dots} \quad (27)$$

onde $u(q)/q$, é a incerteza padrão relativa associada à variável “q” [45].

A incerteza final da medição deve ser avaliada e expressa, de acordo com o definido no GUM [43] pela equação 28,

$$\text{Resultado} = y \pm U [\text{unidades}] \quad (28)$$

“A incerteza reportada é uma incerteza expandida calculada usando um factor de expansão k igual a 2, o que permite associar ao resultado um nível de confiança aproximadamente igual a 95 %”.

A incerteza expandida (U_y) é calculada multiplicando a incerteza padrão combinada (u_y) pelo factor de expansão (k) (equação 29). Recomenda-se um valor de k igual a 2 ou 3 para expandir o nível de confiança para 95 % ou 99 %, respectivamente, para casos em que a incerteza combinada resulta de observações estatísticas com elevado número de graus de liberdade [45].

$$U_y = u_y \times k \quad (29)$$

4.2. Optimização da incerteza de medição

4.2.1. Resposta instrumental

A descrição da resposta instrumental tem em conta não só a tendência média do sinal instrumental em função do teor de analito, mas também o comportamento da dispersão da resposta instrumental na gama de calibração. Quando a dispersão da resposta instrumental ao longo da gama de calibração é constante, esta é designada por relação homoscedástica e, neste caso, a variância da resposta mantém-se constante em toda a gama; quando varia é designada por relação heteroscedástica sendo que, geralmente, a variância da resposta aumenta com o teor de analito [46].

A adequação de modelos de regressão não ponderados (lineares ou quadráticos) aplicados a dados homoscedásticos, pode ser avaliada verificando se a variância na concentração mais alta é significativamente maior do que a variância na concentração mais baixa da curva de calibração, recorrendo, para isso, ao teste de Fisher (teste-F) unilateral [46].

$$F_{\text{calc}} = \frac{s_2^2}{s_1^2} \quad (30)$$

Considerando uma relação linear entre a repetibilidade da resposta instrumental, s , e a concentração x ($s = A + Bx$), à semelhança do que acontece com o sinal y , ($y = a + bx$), para que o modelo de regressão linear não ponderado se adeque ao método de adição de padrão é necessário que:

$$F_{\text{calc}} \leq F_{\text{tab}} \Leftrightarrow \frac{s_2^2}{s_1^2} \leq F_{\text{tab}} \Leftrightarrow \frac{s_2}{s_1} \leq \sqrt{F_{\text{tab}}} \Leftrightarrow \quad (30 \text{ A})$$

$$\Leftrightarrow \frac{A+Bx_2}{A+Bx_1} \leq C \Leftrightarrow A + Bx_2 \leq AC + CBx_1 \Leftrightarrow x_2 \leq \frac{AC-A+CBx_1}{B} \quad (30 \text{ B})$$

em que $C = \sqrt{F_{\text{Tab}}}$, e x_1 e x_2 correspondem à concentração de analito mais baixa e mais alta, respectivamente. E assim, será possível saber qual o intervalo de concentrações que obedece a este critério, contando com as diluições necessárias para a amostra.

4.2.2. Incerteza expandida relativa (U'_y)

Como foi referido em 4.1., uma abogadem subanalítica para a determinação da incerteza de medição, permite saber qual a fonte de incerteza que mais contribui para o valor de incerteza final.

Normalmente a fonte com maior contribuição está associada à resposta instrumental:

$$u_{\text{extra}} = \frac{s_{y/x}}{b} \times \sqrt{\frac{1}{n \times p} + \frac{\bar{y}^2}{b^2 \times p \times \sum_i (x_i - \bar{x})^2}} \quad (31)$$

Tendo em conta uma calibração pelo método de adição de padrão, para otimizar esta componente considerando os custos associados a estas análises, nomeadamente o número de leituras replicadas, pode-se realizar um estudo da variação da incerteza expandida relativa com o factor p (número de medições replicadas), após uma adequada reformulação da equação 24 para a equação 31. As restantes fontes de incerteza têm uma contribuição muito pequena para a incerteza final.

5. Controlo de qualidade

Para se poder garantir e controlar a qualidade dos resultados do dia-a-dia, é necessário avaliar, periodicamente, a exactidão dos resultados, recorrendo ao Controlo de Qualidade interno e externo [47].

5.1. Controlo Interno

Para um laboratório estabelecer um sistema de controlo interno de qualidade, pode recorrer a:

- Materiais de Referência Internos (MRI);
- Técnicas complementares de controlo de qualidade (CQ) de resultados;
- Tratamento estatístico de dados (cartas de controlo ou outros).

Os MRI são materiais estáveis a médio/longo prazo, cuja homogeneidade entre lotes deve ser igual ou superior à precisão exigida aos resultados e cujo valor de referência deve ser atribuído com as devidas precauções para garantir uma exactidão adequada [47].

Como exemplos de técnicas complementares de CQ considera-se:

- Uso de análises em replicado;
- Repetição de análises anteriormente efectuadas;
- Comparação de resultados obtidos por diferentes técnicas analíticas.

A selecção de técnicas complementares de CQ a usar deve ser feita de acordo com a complexidade e dificuldade dos métodos e com as fontes de erro que se pretendem controlar [47].

As cartas de controlo estatístico apresentam de forma fácil, clara e eficiente os resultados das acções de CQ. Nestas cartas podem ser registados os resultados obtidos por repetições de amostras ou desvios entre replicados, entre outros parâmetros [47].

5.2. Controlo Externo

As acções de CQ que um laboratório deve exercer para o controlo externo são:

- Uso de Materiais de Referência Certificados (MRC), ou padrões equivalentes;
- Participação em ensaios interlaboratoriais (EIL), nomeadamente ensaios de aptidão.

Os MRC permitem estabelecer a rastreabilidade das medições químicas e controlar a exactidão do ensaio [47].

Os ensaios de aptidão permitem avaliar a capacidade técnica e organizacional do laboratório para fazer o ensaio, dado que implica caracterizar amostras com teor desconhecido [47].

O laboratório deve analisar os resultados do seu desempenho, durante qualquer uma das acções de CQ, nomeadamente:

- avaliar os desvios observados recorrendo a critérios adequados;
- diagnosticar e identificar as causas de desvios relevantes;
- definir e implementar acções correctivas sempre que pertinentes.

Sempre que não se identificar a origem dos desvios, deve-se intensificar as acções de CQ interno com vista a despistar ou minimizar o impacto desses desvios [47].

6. Metodologia experimental

6.1. Materiais, reagentes e amostras

Balança analítica Mettler Toledo XS205. Agitador automático Ika-Vibrax-VXR. Mufla Nobertherm controller P320. Cromatógrafo iônico Dionex, modelo DX-500, composto por uma bomba isocrática IP20, um detector condutimétrico CD20, um supressor ASRS Ultra II 4 mm e equipado com *software* PeakNet 5.01. Cromatógrafo iônico Dionex, modelo DX-300 com bomba de gradiente (advanced gradient pump), detector condutimétrico II (conductivity detector – II), supressor AMMS 300 4mm e integrador SP4400 da Spectra Physics Analytical. *Loops* de 25, 50 e 100 μL , pré-coluna IonPac AG9-HC, coluna IonPac AS9-HC.

Frascos de polietileno de alta densidade (HDPE) da marca Nalgene de 15 e 30 mL. Seringas de 2 mL BD Discardit II. Pipetas volumétricas de 1, 2, 10 e 20 mL de classe A, e balões volumétricos de 10, 25, 50, 100, 200 e 500 de classe A.

Fluoreto, cloreto, nitrito, brometo, nitrato, fosfato e sulfato de sódio, sólidos p.a., para a preparação de padrões para a otimização da incerteza, em que NaF e NaCl são, ACS da Riedel-de Haën, NaNO_2 , NaNO_3 e Na_2SO_4 , p.a. da Merck, e NaBr e Na_2HPO_4 , AnalaR da BDH Prolabo. Brometo, nitrato e sulfato de sódio, ACS da Sigma-Aldrich, para a preparação de padrões a utilizar no método de adição de padrão. Carbonato de sódio e hidrogenocarbonato de sódio, sólidos p.a. da Merck, usados para a preparação dos eluentes. Ácido sulfúrico concentrado, pureza 96 %, da Panreac, para preparação da solução regenerante (para o supressor AMMS 300). Óxido de prata (Ag_2O) da Riedel-de Haën, para a precipitação do ião cloreto. Água ultrapura tipo I, obtida através de um aparelho Milli-Q Academic da Millipore, para preparação de amostras e padrões.

Amostra de NaCl do laboratório Physikalisch-Technische Bundesanstalt (PTB). Amostras de água salgada dos aquários número 35 e 36 do “Aquário Vasco da Gama”, antes (A) e depois (D) dos sistemas internos de tratamento de águas (referências 35 A, 35 D, 36 A e 36 D). As amostras do aquário número 35 foram recolhidas a 18 de Setembro de 2012 e as do aquário número 36 a 13 de Setembro de 2012.

6.2. Preparação de padrões

6.2.1. Optimização da incerteza

Para a optimização da incerteza de medição, foram preparadas soluções para cada ião, a partir dos sais de sódio p.a., com as concentrações: $(1001 \pm 12) \text{ mg L}^{-1}$ em F^- ; $(1000 \pm 12) \text{ mg L}^{-1}$ em Cl^- ; $(1001 \pm 12) \text{ mg L}^{-1}$ em NO_2^- ; $(1000 \pm 12) \text{ mg L}^{-1}$ em Br^- ; $(1001 \pm 12) \text{ mg L}^{-1}$ em NO_3^- ; $(1001 \pm 12) \text{ mg L}^{-1}$ em PO_4^{3-} ; $(1001 \pm 12) \text{ mg L}^{-1}$ em SO_4^{2-} (as incertezas reportadas são incertezas expandidas calculadas usando um factor de expansão igual a 2, correspondente a um nível de confiança de aproximadamente 95 %). A solução padrão mãe mista e as soluções padrão usadas no método de adição de padrão foram preparadas a partir destas soluções, por diluição.

6.2.2. Método de adição de padrão

6.2.2.1. Amostras de cloreto de sódio

Para a preparação de amostras a analisar por adição de padrão, foram preparadas soluções padrão individuais a partir dos respectivos sais de sódio (categoria ACS) com as concentrações: $(1035 \pm 13) \text{ mg L}^{-1}$ em NO_3^- ; $(1005 \pm 12) \text{ mg L}^{-1}$ em SO_4^{2-} (tal como no ponto 6.2.1., as incertezas reportadas são incertezas expandidas calculadas usando um factor de expansão igual a 2). A partir destas soluções padrão, foram preparadas soluções padrão diluídas ($10,35 \text{ mg L}^{-1}$ de NO_3^- e $6,03 \text{ mg L}^{-1}$ de SO_4^{2-}) as quais foram adicionadas às amostras.

6.2.2.2. Amostras de águas salgadas e água de mar artificial

Para a preparação de soluções padrão diluídas para os iões F^- ($5,01 \text{ mg L}^{-1}$), NO_2^- ($5,00 \text{ mg L}^{-1}$), Br^- ($36,35 \text{ mg L}^{-1}$), NO_3^- ($50,40 \text{ mg L}^{-1}$), Cl^- ($12,50 \text{ mg L}^{-1}$) e SO_4^{2-} ($100,15 \text{ mg L}^{-1}$) foram usadas as soluções padrão com as seguintes concentrações para cada ião:

(1001 ± 12) mg L⁻¹ de F⁻; (1001 ± 12) mg L⁻¹ de NO₂⁻; (1039 ± 13) mg L⁻¹ de Br⁻; (1035 ± 13) mg L⁻¹ de NO₃⁻; (1000 ± 12) mg L⁻¹ de Cl⁻; (1001 ± 12) mg L⁻¹ de SO₄²⁻.

6.3. Preparação de amostras

6.3.1. Amostras de cloreto de sódio

Antes da preparação das soluções amostra de sal, este foi sujeito a secagem na mufla (520 °C), durante 4 h, em cadinhos de porcelana, e arrefecido num exsiccador utilizando sílica-gel como agente exsicante. Este processo permitiu assegurar uma boa secagem para as tomas.

6.3.2. Amostras de água salgada

Para garantir a preservação das amostras, estas foram armazenadas no frigorífico a cerca de 6 °C, e os iões nitrito e nitrato foram analisados num período máximo de 48 h desde a recolha da amostra.

6.3.3. Água do mar artificial

Para proceder ao controlo interno de qualidade foi preparada uma água de mar artificial de acordo com dados bibliográficos [4], e as concentrações de iões obtidas para as amostras de águas salgadas analisadas. A tabela 4 apresenta os valores de concentrações dos iões nesta amostra.

Tabela 4: Concentrações de iões na amostra de água de mar artificial.

	F ⁻	Cl ⁻	NO ₂ ⁻	Br ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻
Concentração /mg L ⁻¹	1,5	19500	10	67,5	207	500

Na sua preparação foram utilizadas as soluções padrão de cada ião com concentrações de (1001 ± 12) mg L⁻¹ de F⁻, (1001 ± 12) mg L⁻¹ de NO₂⁻, (1039 ± 13) mg L⁻¹ de Br⁻, (1035 ± 13) mg L⁻¹ de NO₃⁻ e os sais de NaCl e Na₂SO₄.

6.4. Procedimento

6.4.1. Optimização do método instrumental para a análise de amostras

Nesta fase do trabalho várias condições cromatográficas foram testadas: detecção condutimétrica com e sem supressor para diversos tipos e concentrações de eluente; variação da concentração de eluente composto por Na₂CO₃/NaHCO₃; utilização de eluente composto apenas por Na₂CO₃; adição de várias concentrações de NaCl em eluentes de Na₂CO₃/NaHCO₃; variação do volume do *loop*; variação de condições instrumentais como a gama de *output* e corrente aplicadas ao detector, e o fluxo aplicado; utilização de outro cromatógrafo iónico.

A adequação das alterações referidas foi avaliada pelo comportamento da linha de base e do cromatograma obtido da injeção de soluções preparadas com a amostra de NaCl enviada pelo laboratório PTB, verificando-se se nos cromatogramas os picos dos iões brometo, nitrato e sulfato apresentavam boa resolução.

6.4.2. Optimização da incerteza de medição

A optimização da incerteza de medição envolveu um estudo do desempenho do cromatógrafo iónico numa gama larga de concentrações.

Para estudar a resposta instrumental a diferentes concentrações de iões, as condições instrumentais aplicadas, no caso do cromatógrafo iónico DX-500, foram as seguintes: eluente tampão 3,5 mM de Na₂CO₃ e 1 mM de NaHCO₃, fluxo de 1,2 mL min⁻¹, *loop* de 25 µL, corrente de 50 mA e gama de *output* de 1 µS. A gama de trabalho escolhida para os iões fluoreto e cloreto foi de 0,02-2 mg L⁻¹, para o ião nitrito 0,04-4 mg L⁻¹, para os iões brometo e nitrato 0,1-10 mg L⁻¹, para o ião fosfato 0,5-50 mg L⁻¹ e para o ião sulfato 0,2-20 mg L⁻¹.

Dentro destas gamas foram preparadas, para cada ião, onze soluções padrão de trabalho com concentrações equidistantes para cada ião, por diluição de uma solução padrão mãe mista com as concentrações de iões apresentadas na tabela 5.

Tabela 5: Concentrações de iões na solução padrão mãe mista, utilizada na preparação de padrões usados no estudo do desempenho quantitativo do cromatógrafo DX-500.

	F ⁻	Cl ⁻	NO ₂ ⁻	Br ⁻	NO ₃ ⁻	PO ₄ ³⁻	SO ₄ ²⁻
Concentração /mg L ⁻¹	20	20	40	104	100	500	200

Para o cromatógrafo iónico DX-300, as condições instrumentais aplicadas foram: eluente Na₂CO₃, 9 mM, fluxo de 1,0 mL min⁻¹, *loop* de 100 µL e gama de output de 1000 µS para o cloreto e 10 µS para os restantes iões. A gama de trabalho escolhida para o ião fluoreto foi de 0,04-2 mg L⁻¹, para o ião cloreto 0,4-20 mg L⁻¹, para o ião nitrito 0,08-4 mg L⁻¹, 0,2-10 mg L⁻¹ para os iões brometo e nitrato e para o ião sulfato 0,4-20 mg L⁻¹. Dentro destas gamas foram preparadas onze soluções padrão de trabalho, para cada ião, com concentrações equidistantes para cada ião, por diluição de uma solução padrão mista mãe concentrações de iões apresentadas na tabela 6.

Tabela 6: Concentrações de iões na solução padrão mãe mista, utilizada na preparação de padrões usados no estudo do desempenho quantitativo do cromatógrafo DX-300.

	F ⁻	Cl ⁻	NO ₂ ⁻	Br ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻
Concentração /mg L ⁻¹	20	200	40	101	103	201

As soluções padrão de trabalho, foram preparadas no mesmo balão volumétrico (200 mL), com excepção da solução de menor concentração que foi preparada num balão volumétrico de 500 mL. As medições de volume foram realizadas sempre com a mesma pipeta volumétrica (20 mL). Este procedimento minimiza a incerteza associada à razão das concentrações dos padrões de calibração.

Cada uma das onze soluções padrão foi injectada seis vezes. Os valores das áreas correspondentes a cada anião, em cada solução, foram registados para os subsequentes tratamentos estatísticos.

6.4.3. Análise de amostras de cloreto de sódio pelo método de adição de padrão

Após a optimização do método instrumental, verificou-se ser possível a detecção dos iões nitrato e sulfato mas em condições distintas.

6.4.3.1. Determinação do ião nitrato

Prepararam-se duas soluções amostra pesando duas tomas, 5,01762 g e 5,00936 g de sal, previamente seco, que foram dissolvidas separadamente, até perfazer um volume de 25 mL de água tipo I. A cada fracção de 8 mL de cada solução amostra foram adicionados 1,5 g de Ag_2O , submetendo a mistura a, pelo menos, 2 horas de agitação, seguida de filtração simples, com papel de filtro, para eliminar o precipitado. Para realizar análise a um branco, adicionaram-se 0,37 g de Ag_2O a 3 mL de água tipo I.

A partir de cada solução amostra filtrada, prepararam-se cinco soluções para analisar, medindo 1 mL de solução amostra tratada com Ag_2O e adicionando, a quatro das cinco soluções, 2, 3, 4 e 5 mL de solução padrão de ião nitrato ($10,01 \text{ mg L}^{-1} \text{ NO}_3^-$), perfazendo no final para um volume total de 10 mL.

Para possíveis correcções da concentração de ião nitrato na amostra por contaminações de Ag_2O , foram preparadas duas soluções com o branco, uma com diluição igual à amostra sem adição de solução padrão de ião nitrato, e outra com diluição igual à amostra e com adição de 2 mL de solução padrão do ião.

Estas soluções foram analisadas no cromatógrafo modelo DX-500, com eluente tampão Na_2CO_3 3,5 mM + NaHCO_3 1 mM, o *loop* de 25 μL , um fluxo de $1,2 \text{ mL min}^{-1}$ e a gama de *output* com a condutividade total.

Os valores das áreas foram registados a partir do *software* PeakNet 5.01.

6.4.3.2. Determinação do íão sulfato

Preparou-se uma solução de amostra pesando 1,01156 g de sal, previamente seco, que foi dissolvido para um volume de 50 mL de água tipo I.

Para a análise foram preparadas cinco soluções, para cada uma mediram-se 8 mL de solução de amostra, adicionando-se a quatro das cinco soluções os volumes de 0,8, 1,2, 1,5 e 1,9 mL de solução padrão de íão sulfato ($6,03 \text{ mg L}^{-1} \text{ SO}_4^{2-}$).

Estas soluções foram analisadas no cromatógrafo modelo DX-300, com eluente Na_2CO_3 9 mM, um *loop* de 100 μL , o fluxo de 1 mL min^{-1} e a gama de *output* de 1000 μS para o íão cloreto e 10 μS para o íão sulfato.

Devido à integração incerta por parte do integrador SP4400, no caso do íão sulfato, esse processo foi realizado por peso, recortando-se e pesando os picos obtidos para aquele íão.

6.4.4. Análise de amostras de água salgada e de água de mar artificial pelo método de adição de padrão

Devido às diferentes gamas de concentração dos constituintes das amostras, foram realizadas duas diluições, uma para determinar o íão Cl^- e outra para determinar os íões F^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- e SO_4^{2-} (este último apenas analisado na água de mar artificial). A escolha, tanto do factor de diluição, como das concentrações de padrões a adicionar foi realizada de acordo com o estudo prévio da optimização da incerteza de medição, já que as gamas de concentrações a serem usadas deveriam estar dentro das gamas optimas para o cromatógrafo DX-500.

6.4.4.1. Determinação dos íões fluoreto, nitrito, brometo, nitrato e sulfato

Após uma análise preliminar das amostras de água concluiu-se que uma diluição de 50 vezes seria suficiente para que as concentrações dos íões F^- , NO_2^- , Br^- , NO_3^- e SO_4^{2-} caíssem dentro das gamas já estudadas. Tendo uma estimativa das concentrações destes íões nas amostras diluídas, calcularam-se os valores de concentração máxima a adicionar para cada

ião. Sabendo estes valores, prepararam-se cinco soluções a partir de cada amostra, cada uma com 1 mL, a quatro dos quais foram adicionados diferentes volumes de soluções padrão diluídas (tabelas 7, 8 e 9), perfazendo no final das adições, para um volume final de 50 mL.

Tabela 7: Volumes medidos (mL) na preparação das soluções utilizadas na análise da amostra 35.

Adições	V_{amostra}	V_{F^-}		$V_{\text{NO}_2^-}$		V_{Br^-}		$V_{\text{NO}_3^-}$		V_{final}
		35 A	35 D	35 A	35 D	35 A	35 D	35 A	35 D	
0		0,0	0,0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
1		1,4	1,2	10	3,5	3,0	3,1	3,8	3,8	
2	1	2,4	2,2	15	5,5	4,7	4,8	5,8	5,8	50
3		3,4	3,2	20	7,5	6,4	6,6	7,8	7,8	
4		4,4	4,2	25	9,5	8,1	8,3	9,8	9,8	

Tabela 8: Volumes medidos (mL) na preparação das soluções utilizadas na análise da amostra 36.

Adições	V_{amostra}	V_{F^-}		$V_{\text{NO}_2^-}$		V_{Br^-}		$V_{\text{NO}_3^-}$		V_{final}
		36 A	36 D	36 A	36 D	36 A	36 D	36 A	36 D	
0		0,0	0,0	0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
1		1,4	1,2	4	1,0	2,5	2,4	6,7	5,4	
2	1	2,4	2,2	6	1,7	3,9	3,8	7,7	6,9	50
3		3,4	3,2	8	2,4	5,3	5,2	8,7	8,4	
4		4,4	4,2	10	3,1	6,7	6,6	9,7	9,9	

Tabela 9: Volumes medidos (mL) na preparação das soluções utilizadas na análise da água de mar artificial.

Soluções	V_{amostra}	V_{F^-}	$V_{\text{NO}_2^-}$	V_{Br^-}	$V_{\text{NO}_3^-}$	$V_{\text{SO}_4^{2-}}$	V_{final}
Art. 0		0,0	0	0,0	0,0	0,0	
Art. 1		1,3	4	4,6	5,6	6,2	
Art. 2	1	2,3	6	7,4	7,0	7,5	50
Art. 3		3,3	8	10,1	8,5	8,7	
Art. 4		4,3	10	12,9	10,0	10,0	

Cada solução foi injectada duas vezes no cromatógrafo de modelo DX-500, com eluente tampão Na_2CO_3 3,5 mM + NaHCO_3 1 mM, *loop* de 25 μL , fluxo de 1,2 mL min^{-1} e gama de *output* 1 μS .

6.4.4.2. Determinação do ião cloreto

Para que a concentração de ião cloreto nas soluções amostra se situasse na gama já estudada, foi necessário proceder a uma diluição de 10 000 vezes. Após a estimativa da concentração deste ião nas amostras diluídas, calcularam-se os valores de concentração máxima a adicionar. Sabendo estes valores, diluíram-se as amostras uma primeira vez, medindo 1 mL para um volume final de 100 mL, a partir das quais se prepararam cinco soluções de cada amostra diluída, a quatro das quais foram adicionados diferentes volumes de solução padrão diluída (tabela 10), perfazendo no final das adições, para um volume final de 100 mL.

Tabela 10: Volumes medidos na preparação das soluções utilizadas na análise das amostras 35, 36 e água de mar artificial.

Adições	$V_{\text{amostra diluída}} / \text{mL}$ 100x	$V_{\text{Cl}^-} / \text{mL}$				Água de mar artificial	$V_{\text{final}} / \text{mL}$
		35A	35D	36A	36D		
0		0,0	0	0,0	0,0	0,0	
1		5,6	4,8	5,6	5,6	5,2	
2	1	8,8	8	8,8	8,8	8,8	100
3		12,0	11,2	12,0	12,0	12,4	
4		15,2	14,4	15,2	15,2	16,0	

Cada solução foi injectada três vezes no cromatógrafo de modelo DX-500, com eluente tampão Na_2CO_3 3,5 mM + NaHCO_3 1 mM, o *loop* de 25 μL , um fluxo de 1,2 mL min^{-1} e a gama de *output* 1 μS .

7. Apresentação e discussão dos resultados

7.1. Optimização da incerteza de medição

Partindo da abordagem subanalítica e estando definida a mensuranda e o procedimento, é possível fazer um diagrama representativo das fontes de incerteza a serem consideradas.

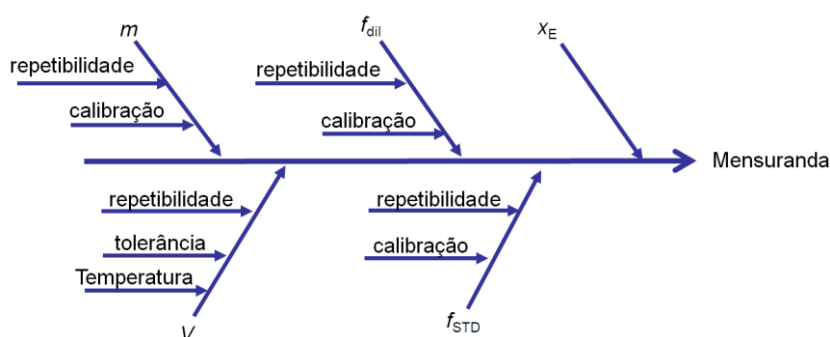


Figura 6: Diagrama de causa-efeito para a determinação da fracção mássica de um anião no sal analisado (ex. análise da composição de sal marinho).

Para o cálculo da incerteza padrão relativa combinada, obedecendo à lei da propagação das incertezas, utiliza-se a equação 32, considerando as componentes representadas no diagrama da figura 6.

$$\frac{u_y}{y} = \sqrt{\left(\frac{u_m}{m}\right)^2 + \left(\frac{u_V}{V}\right)^2 + \left(\frac{u_{f_{dil}}}{f_{dil}}\right)^2 + \left(\frac{u_{f_{STD}}}{f_{STD}}\right)^2 + \left(\frac{s_{X_E}}{X_E}\right)^2} \quad (32)$$

7.1.1. Cálculo da incerteza associada à resposta instrumental (exemplo - ião nitrato)

As gamas de concentração estudadas foram escolhidas após a avaliação do desempenho instrumental numa vasta gama de concentrações dos sete aniões. A gama estudada para cada anião teve em conta o limite de detecção e a linearidade da resposta instrumental em função da concentração.

A título de exemplo, apresentam-se os resultados obtidos para o ião nitrato, com o cromatógrafo DX-500 e as condições apresentadas em 6.4.2..

As áreas obtidas para cada injeção, de cada uma das 11 soluções padrão, são as apresentadas na tabela 11:

Tabela 11: Áreas dos picos de nitrato obtidas para as 11 soluções padrão injectadas.

Conc./mg L ⁻¹	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Rep. 5	Rep. 6
0,1	6738	7549	8810	7445	-	4778
1,0	55603	61588	50695	49624	45192	51417
2,0	115066	110922	105931	113363	113205	111525
3,0	159530	166389	162220	160418	158790	172319
4,0	198569	223982	218651	208746	204769	215637
5,0	266490	266507	289105	279627	278493	269732
6,0	347167	338981	340140	295407*	334994	336194
7,0	374077	405471	377495	395348	400131	391635
8,0	451208	431110*	467039	467134	462185	457000
9,0	525139	522234	490623	516660	520145	503432
10,0	560835	550687	582049	558884	584556	578314

*Valores identificados como aberrantes únicos pelo teste de *Grubbs*, considerando n = 6 e um nível de confiança de 95 % (não foram identificados valores aberrantes emparelhados).

Para a avaliação da existência de valores aberrantes (*outliers*) únicos, emparelhados e antagónicos, recorreremos a testes de *Grubbs* (anexo A1).

Após identificar os valores aberrantes, procedeu-se ao cálculo da média e desvio padrão das áreas dos picos para cada nível de concentração, desprezando aqueles valores. A homogeneidade de variâncias da resposta instrumental ao longo da concentração de analito foi avaliada através de um teste de Fisher (tabela 12).

Tabela 12: Áreas dos picos de nitrato, excluindo valores aberrantes, obtidas para as 11 soluções padrão injectadas e respectivas médias, desvios padrão e parâmetros do teste de Fisher (4.2.1.).

Conc./ mg L ⁻¹	Rep. 1	Rep. 2	Rep. 3	Rep. 4	Rep. 5	Rep. 6	Média áreas	s	F _{cal} *	F _{tab} **
0,1	6738	7549	8810	7445	-	4778	7064	1480	-	-
1,0	55603	61588	50695	49624	45192	51417	52353	5625	14,4	22,5
2,0	115066	110922	105931	113363	113205	111525	111669	3171	3,1	14,9
3,0	159530	166389	162220	160418	158790	172319	163278	5194	2,7	14,9
4,0	198569	223982	218651	208746	204769	215637	211726	9422	3,3	14,9
5,0	266490	266507	289105	279627	278493	269732	274992	8998	1,1	14,9
6,0	347167	338981	340140	-	334994	336194	339495	4762	3,6	14,9
7,0	374077	405471	377495	395348	400131	391635	390693	12492	6,9	14,9
8,0	451208	-	467039	467134	462185	457000	460913	6844	3,3	14,9
9,0	525139	522234	490623	516660	520145	503432	513039	13337	3,8	14,9
10,0	560835	550687	582049	558884	584556	578314	569221	14164	1,1	14,9

* F_{cal} é a razão das variâncias em dois níveis de concentração consecutivos, em que F_{cal} > 1.

** F_{tab} unilateral para (n-1) graus de liberdade e um nível de confiança de 99,5%.

A partir dos valores das áreas obtidos para os aniões, traçaram-se dois gráficos (fig. 7 e 8) para cada anião, um considerando a área média vs. concentração de ião (mg L⁻¹) e outro considerando o desvio padrão das áreas (s) vs. concentração de ião (mgL⁻¹). O primeiro foi produzido com vista a testar a sensibilidade/linearidade ao longo da gama de concentração. O segundo foi produzido para identificar gamas de concentração homoscedásticas e estimar a precisão da resposta instrumental.

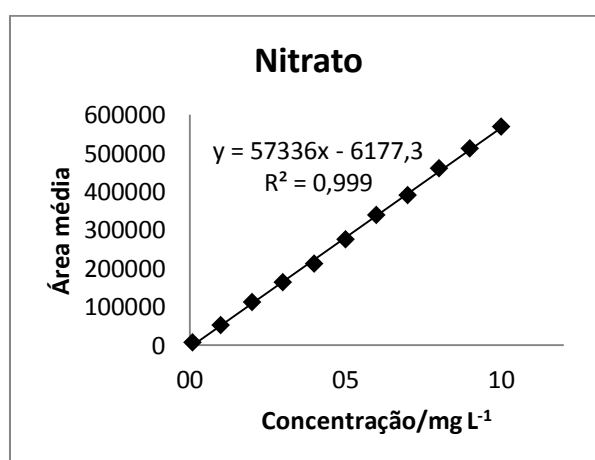


Figura 7: Curva de calibração com a média das áreas dos picos, para o ião nitrato.

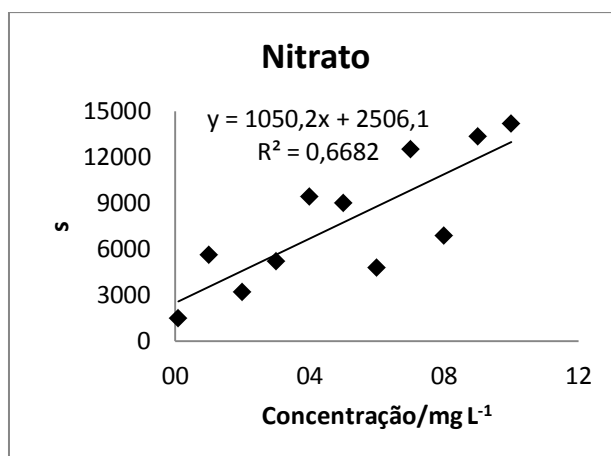


Figura 8: Gráfico do desvio padrão dos sinais vs. concentração (mg L^{-1}), para o ião nitrato.

Os dados reunidos nas figuras 7 e 8 são posteriormente usados para efectuar previsões do desvio padrão de extrapolação, s_{xE} , de rectas de calibração produzidas pelo método de adição de padrão.

Para a equação 31, referente ao desvio padrão s_{xE} :

$$s_{xE} = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{n \times p} + \frac{\bar{y}^2}{b^2 p \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (31)$$

os valores de b e \bar{y}^2 , são retirados da equação da recta apresentada no gráfico do sinal médio vs. concentração de ião (mg L^{-1}) (figura 7) e o $s_{y/x}$ é obtido da equação da recta do gráfico de s vs. concentração de ião (mg L^{-1}) (figura 8).

Para a determinação do termo $\sum (x_i - \bar{x})^2$, considerou-se uma calibração para o método de adição de padrão com cinco pontos equidistantes, visto que, será esta a estratégia adoptada para a análise das amostras de cloreto de sódio e de água salgada.

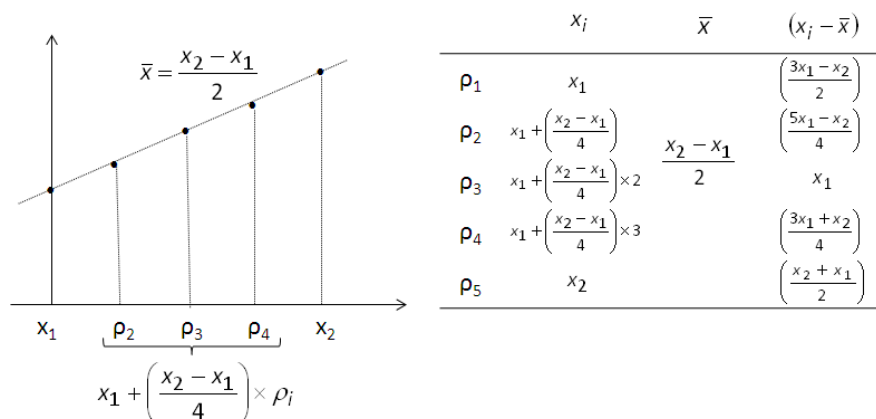


Figura 9: Gráfico representativo de uma curva de adição de padrão com 5 pontos equidistantes e tabela com as equações gerais para as diferenças entre concentração adicionada e média.

De acordo com as equações gerais apresentadas na tabela da figura 9, o termo $\sum (x_i - \bar{x})^2$ pode ser igualado a uma equação quadrática (equação 33) que relaciona as incógnitas x_1 (concentração estimada de ião/analito na amostra) e x_2 (x_1 mais a concentração máxima de ião/analito a ser adicionada à amostra).

$$\begin{aligned} \sum (x_i - \bar{x})^2 &= \left(\frac{3x_1 - x_2}{2}\right)^2 + \left(\frac{5x_1 - x_2}{4}\right)^2 + (x_1)^2 + \left(\frac{3x_1 + x_2}{4}\right)^2 + \left(\frac{x_2 + x_1}{2}\right)^2 = \\ &= \frac{45x_1^2 - 10x_1x_2 + 5x_2^2}{8} \end{aligned} \quad (33)$$

Para a determinação do valor de x_2 , teve-se como base o facto de a equação de s_{xE} ser válida apenas se o modelo de regressão linear não ponderado for adequado para descrever a curva de calibração. Para que esta situação se verifique, é necessário que a variância à concentração mais alta não seja significativamente diferente da variância à concentração mais baixa, como demonstrado na equação (30 A).

$$F_{calc} \leq F_{tab} \Leftrightarrow \frac{s_2^2}{s_1^2} \leq F_{tab} \Leftrightarrow \frac{s_2}{s_1} \leq \sqrt{F_{tab}} \quad (30 A)$$

Substituindo s_1 e s_2 por equações de recta, do gráfico de s vs. concentração de ião (mg L^{-1}) na solução padrão, e o termo $\sqrt{F_{tab}}$ pela incógnita C , obtém-se:

$$\frac{A+Bx_2}{A+Bx_1} \leq C \Leftrightarrow A + Bx_2 \leq AC + CBx_1 \Leftrightarrow x_2 \leq \frac{AC-A+CBx_1}{B} \quad (30 \text{ B})$$

onde x_1 e x_2 representam as concentrações mínima e máxima de ião/analito nas soluções de calibração, respectivamente.

Conhecendo o valor de x_1 , é possível calcular o valor de x_2 , e substituindo estas duas incógnitas na equação 33, é possível chegar ao valor de $\sum(x_i - \bar{x})^2$.

Para o ião nitrato, recorrendo à equação da recta da figura 8, obtemos a equação 34 para o cálculo do valor de x_2 , partindo da equação 30 B.

$$F_{calc} \leq F_{tab} \Leftrightarrow \frac{A + Bx_2}{A + Bx_1} \leq \sqrt{23,15} \Leftrightarrow x_2 \leq \frac{A \times 4,81 - A + 4,81 \times B \times x_1}{B} \Leftrightarrow$$

$$x_2 \leq \frac{9548,24 + 5051,46x_1}{1050,2} \Leftrightarrow x_2 \leq 9,09 + 4,81x_1 \quad (34)$$

O valor de F_{tab} é 23,15 (para testes bilaterais) para um nível de confiança de 99 %, com n_1 e n_2 igual a 4 (5 pontos de calibração).

Substituindo o resultado obtido para x_2 na equação 33 obtém-se:

$$\sum(x_i - \bar{x})^2 = 14,08x_1^2 + 497,48x_1 + 51,7 \quad (35)$$

Desta forma, conhecendo apenas o valor de x_1 , é possível prever a incerteza associada à extrapolação do sinal da amostra após a adição de padrão, $s_{x_{Ei}}$, considerando o número de medidas replicadas i (de 1 a 5).

Tendo em conta o exemplo dado, ião nitrato, os valores de incerteza padrão relativa associada à extrapolação do sinal da amostra, considerando o número de medidas replicadas, são apresentados na tabela 13 e na figura 10.

Tabela 13: Valores da incerteza padrão relativa associada à concentração de nitrato na solução da amostra, estimada por extrapolação.

$x_1/\text{mg L}^{-1}$	$s_{y/x}$	y^2	$\sum(x_i - \bar{x})^2$ $\text{mg}^2 \text{L}^{-2}$	$s'_{\text{XE } p_1}$	$s'_{\text{XE } p_2}$	$s'_{\text{XE } p_3}$ mg L^{-1}	$s'_{\text{XE } p_4}$	$s'_{\text{XE } p}$
0,10	2611,23	1,918E+05	101,64	0,2035	0,1439	0,1175	0,1017	0,0910
1,00	3557,35	2,623E+09	563,78	0,0278	0,0197	0,0162	0,0141	0,0126
2,00	4608,60	1,180E+10	1104,09	0,0181	0,0129	0,0106	0,0093	0,0083
3,00	5659,85	2,756E+10	1672,61	0,0149	0,0107	0,0088	0,0077	0,0070
4,00	6711,10	4,991E+10	2269,34	0,0133	0,0095	0,0079	0,0070	0,0063
5,00	7762,35	7,884E+10	2894,29	0,0123	0,0089	0,0074	0,0065	0,0059
6,00	8813,60	1,144E+11	3547,46	0,0117	0,0085	0,0071	0,0063	0,0057
7,00	9864,85	1,565E+11	4228,84	0,0113	0,0082	0,0069	0,0061	0,0056
8,00	10916,10	2,052E+11	4938,44	0,0110	0,0080	0,0067	0,0060	0,0055
9,00	11967,35	2,605E+11	5676,26	0,0107	0,0078	0,0066	0,0059	0,0054
10,01	13018,60	3,223E+11	6442,29	0,0105	0,0077	0,0065	0,0058	0,0053

s'_{XE} calculado, considerando n igual a 5 (pontos de adição de padrão equidistantes)

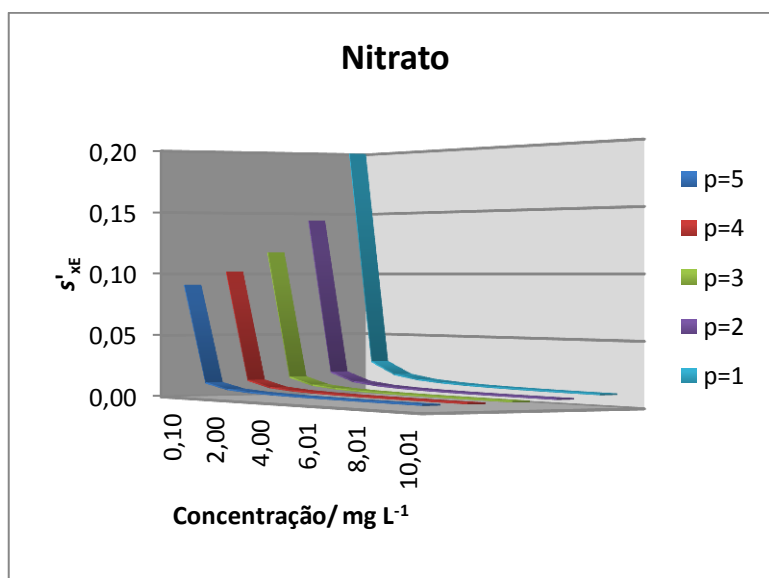


Figura 10: Variação da incerteza padrão relativa com a concentração de íão nitrato na solução amostra diluída e com o número de medidas replicadas, p.

7.1.2. Cálculo da incerteza expandida relativa, U'_y

Para o cálculo da incerteza expandida relativa U'_y , é necessário determinar os valores das restantes componentes consideradas (figura 6), u'_m , u'_v , u'_{Fdil} , u'_{fSTD} , para se poder traçar um gráfico U'_y vs. p (número de medidas replicadas).

A título de exemplo, para o cálculo do factor u'_m , considerou-se uma pesagem por diferença de 0,250 g de amostra, numa balança com repetibilidade estudada e um dado erro máximo (anexo A2):

$$u'_m = \frac{\sqrt{2(u_{Bal}^{Cal})^2 + 2(u_{Bal}^{Rep})^2}}{m} = \frac{0,0001372}{0,250} = 0,000549 \quad (36)$$

Dissolvendo esta massa num balão volumétrico de 100 mL, com tolerância fornecida pelo fabricante, repetibilidade estudada (anexo A2) e sem diferença significativa da temperatura do ensaio, considerando os 20 °C de referência para o material volumétrico:

$$u'_v = \frac{\sqrt{(u_V^{Cal})^2 + (u_V^{Rep})^2}}{V} = \frac{0,05805}{100} = 0,000581 \quad (37)$$

Após a dissolução do sal, se se proceder a uma diluição de 10x (5/50), a componente desta etapa é calculada pela equação 38:

$$u'_{Fdil} = \sqrt{\left(\frac{0,01843}{5}\right)^2 + \left(\frac{0,03734}{50}\right)^2} = 0,000376 \quad (38)$$

Em suma, apresentam-se, na tabela 14, os valores de incerteza relativa associados à pesagem da massa, dissolução do sal e diluição da solução da amostra.

Tabela 14: Valores das incertezas relativas para as componentes da incerteza relativa final do exemplo apresentado.

Incerteza relativa	
u'_m	0,0015
u'_v	0,00058
u'_{Fdil}	0,00038

A incerteza associada à preparação da solução padrão diluída, tem diferentes componentes. Uma delas é a incerteza relativa associada à solução padrão mãe do anião:

$$u'_{STD} = \frac{U_c/k}{c} \quad (39)$$

U_c – incerteza expandida associada à preparação da solução padrão mãe;

k – coeficiente de expansão (normalmente é igual a 2).

A incerteza padrão relativa, para a solução padrão do ião nitrato, calculada através da equação 39, é 0,006.

Tabela 15: Valor de concentração, coeficiente de expansão, incerteza expandida e incerteza padrão relativa para a solução padrão do ião nitrato.

Solução Padrão de Nitrato	
Conc. /mg L ⁻¹	1001
k	2
U_c	12
u'_{STD}	0,0060

Outra componente está associada à diluição da solução padrão de cada anião utilizando uma pipeta (por exemplo, 20 mL) e um balão (exemplo, 200 mL) na sua preparação.

Para o cálculo da componente associada à diluição da solução mãe de nitrato, da equação 22, tem-se:

$$u'_{F_{dil}} = \sqrt{\frac{(u_{V_{pip}}^{Cal})^2 + (u_{V_{pip}}^{Rep})^2}{V_{pip}} + \frac{(u_{V_{Bal}}^{Cal})^2 + (u_{V_{Bal}}^{Rep})^2}{V_{Bal}}} =$$

$$= \sqrt{\frac{(0,0167)^2 + (0,0346)^2}{4} + \frac{(0,0577)^2 + (0,0358)^2}{200}} = 0,06087 \quad (40)$$

Desta solução mãe são adicionados diferentes volumes à amostra. A incerteza associada a este passo é desprezável se se usar a mesma pipeta e o mesmo balão volumétrico na preparação da solução a analisar.

Este pressuposto é avaliado pela condição:

$$u'_{\text{Rmax}} \leq \frac{\text{RSD}}{3} \quad (41)$$

$$u'_{\text{Rmax}} = \frac{u_{\text{Rmax}}}{\text{Rmax}} = \sqrt{2 \left(\frac{u_p}{p}\right)^2 + 2 \left(\frac{u_f}{f}\right)^2} \quad (42)$$

em que, u'_{Rmax} é a incerteza padrão relativa máxima da razão de concentrações e RSD é o desvio padrão relativo mínimo que quantifica a repetibilidade do sinal instrumental à concentração mais alta da gama de trabalho, p representa a pipeta usada na adição, cuja tolerância não é considerada em u_p visto que se usa a mesma pipeta, f representa o volume do balão volumétrico [48].

De acordo com o procedimento experimental deste trabalho, essa condição é demonstrada por:

$$\frac{u'_{F_{\text{dil}i}}}{F_{\text{dil}j}} \leq \left(\frac{s_{y/x}}{\bar{y}_{\text{padrão mais alto}}} \right) / 3 \quad (43)$$

onde i se refere à adição de um dado volume de analito, j se refere à adição imediatamente a seguir, $s_{y/x}$ é o desvio padrão residual da curva de calibração e $\bar{y}_{\text{padrão mais alto}}$ representa a área média obtida para o padrão de maior concentração da curva de calibração. Na equação 44, u'_{VI_i} , u'_{VF_i} , u'_{VI_j} e u'_{VF_j} representam as incertezas padrão relativas do volume inicial e final medido para a adição i e para a adição j , respectivamente.

$$\frac{u'_{F_{\text{dil}i}}}{F_{\text{dil}j}} = \sqrt{(u'_{VI_i})^2 + (u'_{VF_i})^2 + (u'_{VI_j})^2 + (u'_{VF_j})^2} \quad (44)$$

Querendo isto dizer que, a incerteza associada à proporcionalidade da adição de analito à amostra, é desprezável se esta representar menos de 1/3 da repetibilidade relativa da resposta instrumental.

Se se considerar adições da solução padrão à amostra com acréscimos de 2 mL para cada ponto, como esquematizado na figura 11:

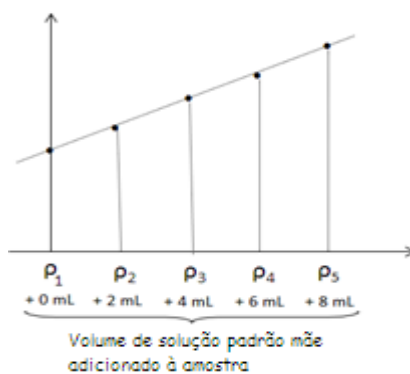


Figura 11: Gráfico de representação de uma curva de adição de padrão, com 5 pontos.

e que, durante este processo de adição, se utilizou sempre a mesma pipeta (20 mL) permitindo desprezar a respectiva componente da calibração/tolerância, e sempre o mesmo tipo de balão na diluição (500 mL), o cálculo da componente da diluição para a adição nas soluções menos concentradas faz-se de acordo com a equação 45:

$$u'_{F_{dilj}} = \sqrt{\left(\frac{u_{pip}^{Rep}}{V}\right)^2 + \left(\frac{u_{pip}^{Rep}}{V}\right)^2 + 2\left(\frac{(u_{bal}^{Cal})^2 + (u_{bal}^{Rep})^2}{V}\right)^2} =$$

$$\sqrt{\left(\frac{0,0167}{2}\right)^2 + \left(\frac{0,0167}{4}\right)^2 + 2\left(\frac{0,144^2 + 0,0175^2}{500}\right)^2} = 0,00936 \quad (45)$$

A componente correspondente ao RSD, isto é, o desvio padrão relativo que quantifica a repetibilidade do sinal instrumental à concentração mais alta da gama de trabalho para o ião nitrato, é calculada através da equação 46:

$$\left(\frac{s_{y/x}}{\bar{y}_{padr\tilde{a}o \text{ mais alto}}}\right)/3 = \left(\frac{13018,6}{569220,83}\right)/3 = 0,00762 \quad (46)$$

considerando a informação apresentada na tabela 12.

Como $0,00936 > 0,00762$, é necessário calcular o valor do teste- F para n_1 igual a 20, pois 20 graus de liberdade é o menor valor para o qual um factor de cobertura igual a 2 é adequado para definir um nível de confiança de aproximadamente 95 %, e n_2 igual a 5 (seis medições replicadas para cada nível de concentração).

$$F_{\text{cal}} = \frac{(0,00936)^2}{(0,00762)^2} = 1,509 \quad (47)$$

Como F_{cal} é igual a 1,509 e $F_{\text{tab}(0,05;20;5)}$ é igual a 4,558, a componente associada à adição da solução padrão à amostra pode ser desprezada.

Assim, a incerteza padrão relativa associada à preparação da solução padrão diluída de ião nitrato é:

$$u'_{\text{std}} = \sqrt{(u'_{\text{STD}})^2 + (u'_{\text{Fdil}})^2} = \sqrt{(0,006)^2 + (0,0609)^2} = 0,06116 \quad (48)$$

Tendo conhecimento de todos os valores das componentes de incerteza, calcula-se, por fim, a incerteza relativa expandida para o ião, de acordo com as equações 32 e 29, e o número de medidas replicadas (p).

Os valores de incerteza expandida relativa, com base nos dados para o ião nitrato, são apresentados na tabela 16.

Tabela 16: Valores da incerteza expandida relativa associada à resposta instrumental (U'_{SxE}), de acordo com a concentração de ião nitrato e o número de medidas replicadas.

$x_1/\text{mg L}^{-1}$	$U'_{\text{SxE}} p_1$	$U'_{\text{SxE}} p_2$	$U'_{\text{SxE}} p_3$	$U'_{\text{SxE}} p_4$	$U'_{\text{SxE}} p_5$
0,10	0,40764	0,28875	0,23617	0,20488	0,18356
1,00	0,06059	0,04619	0,04027	0,03695	0,03481
2,00	0,04343	0,03523	0,03204	0,03031	0,02923
3,00	0,03823	0,03208	0,02975	0,02852	0,02775
4,00	0,03581	0,03066	0,02874	0,02774	0,02711
5,00	0,03443	0,02987	0,02819	0,02731	0,02677
6,01	0,03354	0,02938	0,02785	0,02706	0,02657
7,01	0,03294	0,02905	0,02763	0,02689	0,02644
8,01	0,03250	0,02881	0,02747	0,02678	0,02635
9,01	0,03217	0,02864	0,02736	0,02670	0,02629
10,01	0,03191	0,02851	0,02728	0,02664	0,02625

$U'_{\text{SxE}}p$ calculado considerando $k=2$ para um nível de confiança de 95 %.

Para uma melhor visualização dos dados, foi traçado o gráfico da figura 12, que representa U'_y vs. concentração de ião (mg L^{-1}).

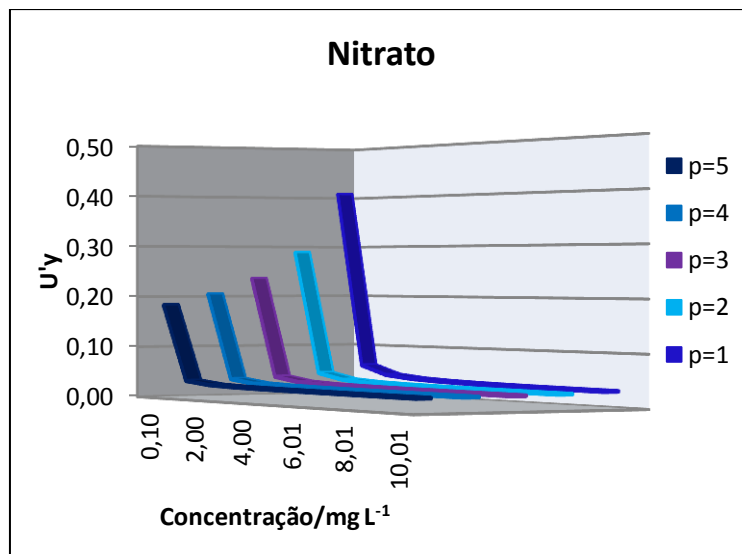


Figura 12: Variação da incerteza expandida relativa com a concentração de ião nitrato na solução amostra diluída e com o número de medidas replicadas, p .

Fazendo uma ampliação do gráfico da figura 12 (figura 13), para valores de incerteza expandida relativa de cerca de 0,05, é possível verificar que os valores de U'_y diminuem exponencialmente com o aumento do valor de concentração, e que para 3, 4 e 5 medições replicadas, o valor de U'_y para os diferentes níveis de concentração é aproximadamente o mesmo.

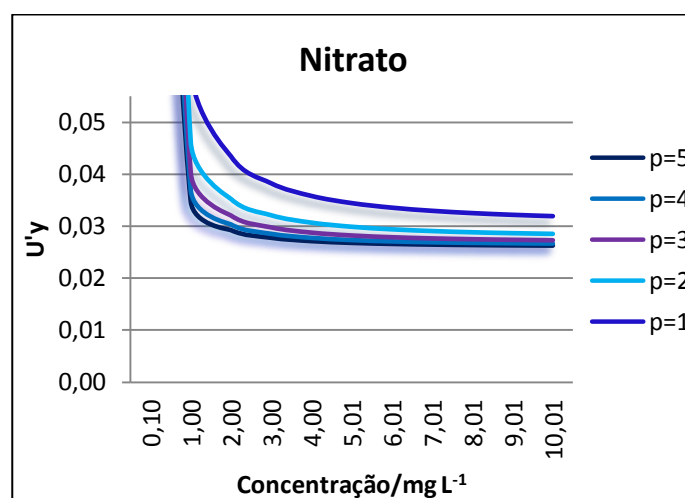


Figura 13: Ampliação do gráfico anterior (figura 12) na gama de incerteza expandida relativa mais baixa.

7.2. Análise de amostras de sal pelo método de adição de padrão

7.2.1. Determinação da concentração de íão nitrato e íão sulfato no sal

Após a análise das soluções preparadas para cada toma, para cada íão, traçaram-se os gráficos de área vs. concentração adicionada de íão (mg L^{-1}), como se mostra nas figuras 14, 15 e 16, para os íões nitrato e sulfato.

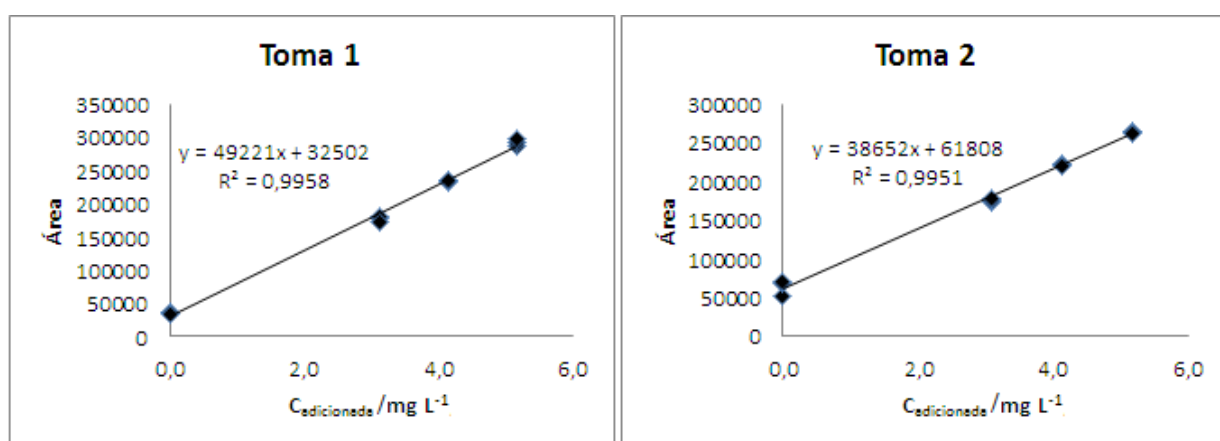


Figura 14: Curvas de calibração, obtidas pelo método de adição de padrão, para o íão nitrato e as duas tomas de amostra.

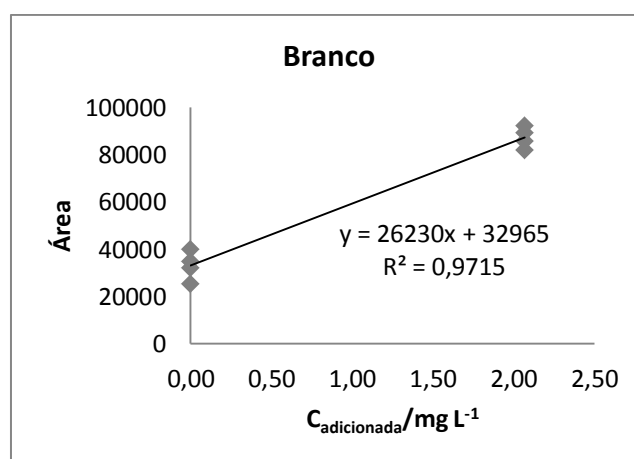


Figura 15: Curva de calibração, obtida pelo método de adição de padrão, para o íão nitrato e para a toma de branco.

Como já foi referido, para o íão sulfato, procedeu-se à determinação do sinal instrumental por pesos, e é por este motivo que os gráficos para o íão sulfato foram traçados segundo o peso do pico vs. concentração adicionada (mg L^{-1}).

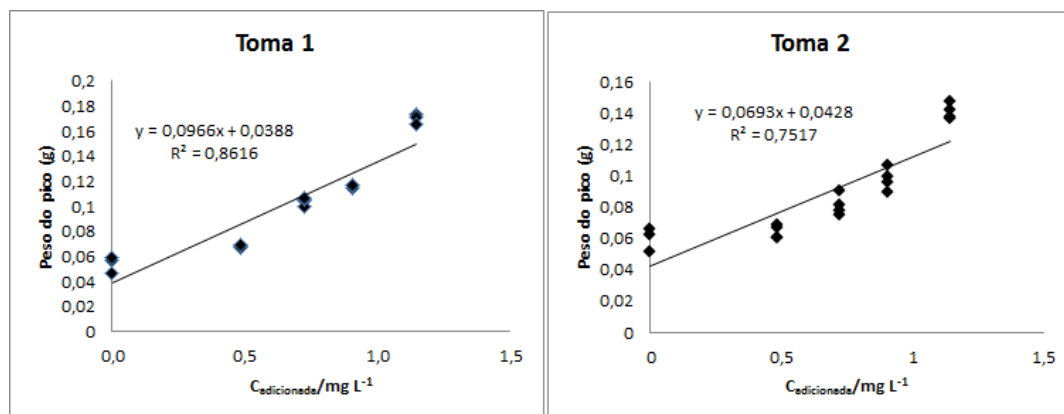


Figura 16: Curvas de calibração, obtidas pelo método de adição de padrão, para o ião sulfato e para as duas tomas de amostra.

A partir das respectivas curvas de calibração é possível calcular (equação 49) a concentração de ião presente na solução amostra após uma diluição da toma V_x para um volume final V .

$$\beta_x = \frac{b_0}{b_1} \times \frac{V}{V_x} \quad (49)$$

onde, β_x representa a concentração de analito na solução amostra, b_0 é o valor da intercepção no eixo dos yy e b_1 é o declive da curva [39].

Recorrendo às equações das curvas de calibração por adição de padrão (figuras 14 e 16), as concentrações de ião nitrato em solução são 5,179 e 12,332 mg L⁻¹ e para o sulfato são de 0,504 e 0,625, para as tomas 1 e 2, respectivamente.

Estes valores de concentrações são respeitantes às soluções amostra preparadas e não às concentrações dos iões no sal. Para esse cálculo é necessário considerar vários factores como demonstrado na equação (50).

$$C_{\text{final}} = \frac{x_E \times \left(\frac{V}{V_x}\right) \times V_1}{m_{\text{amostra}}/1000} \quad (50)$$

Para o ião nitrato foi necessário fazer a correcção do valor de concentração obtido pela equação da curva de calibração, considerando o valor de concentração obtido para o

branco. Como tal, são feitas alterações à equação 50 de acordo com a correcção feita, chegando-se à equação 51.

$$C_{\text{final}} = \frac{(x_E - x_{\text{Branco}}) \times \left(\frac{V_1}{V_x}\right) \times V_1}{m_{\text{amostra}}/1000} \quad (51)$$

onde x_E representa a concentração de ião (mg L^{-1}) obtida pela equação da curva de calibração para a amostra $\left(\frac{b_0}{b_1}\right)$, x_{Branco} é a quantidade de nitrato na amostra resultante da contaminação do Ag_2O com este ião (equação 52) e V_1 o volume em que foi dissolvida a amostra pesada (m_{amostra}). Os resultados obtidos pelas equações 50 e 51 são expressos em mg kg^{-1} .

$$x_{\text{Branco}} = x_{\text{recta branco}} \times \left(\frac{Q_{\text{Ag}_2\text{O amostra}}}{V_{\text{amostra}}} / \frac{Q_{\text{Ag}_2\text{O água}}}{V_{\text{água}}} \right) \quad (52)$$

Em que $x_{\text{recta branco}}$ representa a concentração de ião (mg L^{-1}) obtida pela equação da curva de calibração para o branco, $Q_{\text{Ag}_2\text{O amostra}}$ corresponde à quantidade de óxido presente no volume de amostra, V_{amostra} , e $Q_{\text{Ag}_2\text{O água}}$ corresponde à quantidade de óxido presente no volume de água, $V_{\text{água}}$. Os factores de diluição da amostra e do branco são considerados no cálculo da contaminação de nitrato.

Na tabela 17 são apresentados os valores de concentração de ião nitrato e sulfato no sal, para cada toma.

Tabela 17: Valores necessários para o cálculo da concentração final dos iões nitrato e sulfato no sal.

	$x_E/\text{mg L}^{-1}$	F_{dil}	V_1/mL	$m_{\text{amostra}}/\text{g}$	$C_{\text{ião}}/\text{mg kg}^{-1}$
NO_3^- toma 1	0,660	10	25	5,01765	[0;30]*
NO_3^- toma 2	1,599	10	25	5,00936	[0;32]*
SO_4^{2-} toma 1	0,401	1,25	50	1,01191	25
SO_4^{2-} toma 2	0,618	1,25	50	1,01191	38

*A concentração de ião nitrato na amostra é menor ou igual a 30, não existindo assim, evidências da presença de analito.

7.2.2. Cálculo da incerteza de medição para a determinação de ião nitrato e ião sulfato no sal

Para o cálculo da incerteza expandida associada à medição da concentração dos analitos na amostra de sal, teve-se em conta as fontes de incerteza representadas no diagrama de causa efeito da figura 6 e a equação 32, para o cálculo da incerteza relativa combinada.

A componente s_{xE} foi calculada segundo a equação (24):

$$s_{XE} = \frac{s_{y/x}}{b} \sqrt{\frac{1}{n} + \frac{\bar{y}^2}{b^2 \sum (x_i - \bar{x})^2}} \quad (24)$$

Tendo em conta a informação dos gráficos das figuras 14 e 15 para o ião nitrato, e da figura 16 para o ião sulfato, os correspondentes valores de s'_{xE} obtidos são os que se apresentam na tabela 18:

Tabela 18: Valores utilizados para o cálculo de s'_{xE} para os iões nitrato e sulfato.

	$s_{y/x}$	b	n	\bar{y}	$\sum \frac{(x_i - \bar{x})^2}{\text{mg}^2 \text{ L}^{-2}}$	$x_E/\text{mg L}^{-1}$	$s_{xE}/\text{mg L}^{-1}$	s'_{xE}
NO ₃ ⁻ toma 1	6809,277	49221,405	12	185306,00	44,974	0,660	0,087	0,132
NO ₃ ⁻ toma 2	5735,631	38652,406	12	181801,00	44,974	1,599	0,112	0,070
SO ₄ ²⁻ toma 1	0,02	0,097	16	0,10	2,304	0,401	0,120	0,300
SO ₄ ²⁻ toma 2	0,02	0,069	16	0,09	3,093	0,618	0,175	0,283

Na tabela 19 apresentam-se os valores utilizados para o cálculo da componente de incerteza relativa (u'_m) associada à pesagem do sal para a preparação das soluções de amostra.

Tabela 19: Massa de sal pesada (m_{pesada}) para a preparação das soluções para determinação dos íões nitrato e sulfato e respectiva u'_m .

	u_m/g	$m_{\text{pesada}}/\text{g}$	u'_m
NO_3^- toma 1	0,00043	5,01762	0,00009
NO_3^- toma 2		5,00936	0,00009
SO_4^{2-} toma 1		1,01191	0,00043
SO_4^{2-} toma 2		1,01191	0,00043

Para o íão sulfato, a quantidade de sal pesada foi dissolvida até perfazer um volume de 50 mL; no caso do íão nitrato, a quantidade de sal pesada foi dissolvida até perfazer um volume de 25 mL. Tendo em conta a tolerância fornecida pelo fabricante e a repetibilidade estudada para o material volumétrico usado (anexo A2) as incertezas padrão relativas associadas à medição do volume para a dissolução do sal calculada para os íões nitrato e sulfato são de 0,00093 e 0,00137, respectivamente.

$$u'_{V_{25 \text{ mL}}} = \frac{\sqrt{(u_V^{\text{Cal}})^2 + (u_V^{\text{Rep}})^2}}{V} = \frac{0,02337}{25} = 0,000935 \quad (53)$$

$$u'_{V_{50 \text{ mL}}} = \frac{\sqrt{(u_V^{\text{Cal}})^2 + (u_V^{\text{Rep}})^2}}{V} = \frac{0,06869}{50} = 0,001374 \quad (54)$$

Na preparação das soluções a analisar, a solução amostra preparada foi ainda diluída para ambos os íões, num balão volumétrico de 10 mL. A tabela 20 mostra os valores utilizados para calcular a incerteza relativa associada a este passo do procedimento.

Tabela 20: Valores utilizados para o cálculo da u'_{Fdil} para os íões nitrato e sulfato.

Íão	$V_{\text{amostra}}/\text{mL}$	$V_{\text{final}}/\text{mL}$	u'_{V1}	u'_{V2}	u'_{Fdil}
NO_3^-	1	10	0,0232	0,0036	0,0235
SO_4^{2-}	8		0,0029		0,0046

Tratando-se de uma determinação por adição de padrão, há que ter em conta a incerteza relativa associada à solução padrão, que inclui a incerteza da preparação da solução a partir do sólido e a diluição a que é sujeita.

Na tabela 21 estão expressas as incertezas expandidas das soluções padrão preparadas a partir do sólido.

Tabela 21: Concentração inicial e correspondente incerteza expandida das soluções padrão dos iões nitrato e sulfato.

	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻
$C_{\text{inicial}}/\text{mg L}^{-1}$	1035	1005
U_c	13	12
k	2	2

A partir destas soluções padrão, foram preparadas soluções padrão diluídas com as quais foram efectuadas adições à amostra. O cálculo das incertezas associadas a essas diluições foi executado considerando a equação 22, e os resultados estão apresentados na tabela 22.

Tabela 22: Volume de solução padrão medido e $u'_{\text{Fdil STD}}$ para os iões nitrato e sulfato.

lão	$V_{\text{padrão}}/\text{mL}$	$V_{\text{final}}/\text{mL}$	u'_{V1}	u'_{V2}	$u'_{\text{Fdil STD}}$
NO ₃ ⁻	2	200	0,0116	0,0003	0,0116
SO ₄ ²⁻	3	500	0,0077	0,0003	0,0077

A incerteza associada à adição de diferentes volumes de solução padrão diluída às amostras também foi calculada, para se avaliar se se verifica a condição imposta pela equação 40, já referida no ponto 7.1.2..

Para o ião nitrato, os menores volumes adicionados à amostra foram 2 mL, V_A , e 3 mL, V_B , para o ião sulfato foram 0,8 mL, V_A , e 1,2 mL, V_B . A tabela 23 apresenta os valores calculados que permitem afirmar que a componente de incerteza associada a este passo é desprezável.

Tabela 23: Valores dos parâmetros necessários para a verificação da condição que permite desprezar a incerteza associada à adição de padrão à amostra.

lão	u'_{VA}	u'_{VB}	$u'_{Vf} (10 \text{ mL})$	R'_{max}	$S_{y/x} \text{ conc. +alta.}$	$Y_{\text{conc. +alta}}$	$[s/Y]/3$
NO ₃ ⁻	0,0010	0,0006	0,0036	0,0052	15297,9	565621,7	0,0090
SO ₄ ²⁻	0,0024	0,0016		0,0058	42045,6	1496117	0,0094

Tendo em conta que $R'_{max} < ([s/Y]/3)$, pode-se considerar que a razão das concentrações de analito adicionadas é afectada de uma incerteza desprezável considerando a precisão da resposta do cromatógrafo.

Assim, as incertezas relativas associadas à preparação das soluções padrão são as que constam na tabela 24:

Tabela 24: Incertezas padrão relativas para o cálculo de u'_{fstd} , para as soluções padrão de ião nitrato e sulfato.

ião	u'_{STD}	$u'_{Fdil STD}$	u'_{fstd}
NO_3^-	0,0062	0,0116	0,0132
SO_4^{2-}	0,0060	0,0046	0,0076

Com todas as incertezas padrão relativas associadas à medição calculadas, calcula-se a incerteza expandida relativa para cada ião, tabela 25. Para o ião nitrato recorreu-se a um factor de expansão (k) de 3,707, correspondente ao valor *t-student* tabelado para um nível de confiança de 99 % e 6 graus de liberdade, que correspondem ao número de graus de liberdade para o cálculo de x_{Branco} . Para o ião sulfato recorreu-se a um factor de expansão de 2 para um nível de confiança de, aproximadamente, 95 %.

Tabela 25: Incertezas relativas expandidas para os iões nitrato e sulfato.

	k	$C_{\text{ião no sal}} / \text{mg kg}^{-1}$	U'_c
NO_3^- toma 1	3,707	[0;30]	30
NO_3^- toma 2		[0;32]	32
SO_4^{2-} toma 1	2	25	15
SO_4^{2-} toma 2		38	22

7.3. Análise de amostras de águas salgadas e de água de mar artificial pelo método de adição de padrão

7.3.1. Estudo prévio das amostras de água salgada e de água de mar artificial

Seguindo o estudo de optimização, foi realizada uma avaliação prévia das amostras para se tomar conhecimento das concentrações dos iões nas mesmas. Foram testadas várias diluições para que as concentrações, x_1 , dos iões fluoreto e cloreto se situassem entre 0,02 - 2 mg L⁻¹, do ião nitrito entre 0,04 - 4 mg L⁻¹, dos iões brometo e nitrato entre 0,1 - 10 mg L⁻¹ e do ião sulfato entre 0,2 - 20 mg L⁻¹. Depois de saber qual a diluição da amostra a realizar e o valor da concentração, x_1 , de cada ião na amostra diluída, foi possível estimar o valor de x_2 , isto é, a concentração na amostra mais a adição de padrão mais alta, para cada ião, através da equação 30 B e das equações dos gráficos do desvio padrão de áreas (s) vs. concentração de ião (mg L⁻¹) obtidos no estudo de optimização no cromatógrafo DX-500.

Os valores de concentração, x_1 e x_2 , para os iões analisados nas amostras de águas salgadas e na de água de mar artificial, são apresentados na tabela 26.

Tabela 26: Concentrações x_1 e x_2 (mg L⁻¹) de cada ião para as amostras de águas salgadas e de água de mar artificial.

Amostra	C_F^-		C_{Cl}^-		$C_{NO_2}^-$		C_{Br}^-		$C_{NO_3}^-$		$C_{SO_4}^{2-}$	
	x_1	x_2	x_1	x_2	x_1	x_2	x_1	x_2	x_1	x_2	x_1	x_2
35 A	0,04	0,50	0,2	1,8	0,50	2,60	0,90	6,0	1,80	9,80	-	-
35 D	0,02	0,40	0,3	1,9	0,15	0,90	1,00	6,5	1,85	9,85	-	-
36 A	0,04	0,50	0,2	1,8	0,20	1,20	0,80	5,6	5,70	9,70	-	-
36 D	0,02	0,40	0,2	1,8	0,03	0,34	0,75	5,3	3,90	9,90	-	-
Artificial	0,03	0,49	0,2	2,0	0,20	1,00	1,35	10,0	4,14	10,0	10	20

Ainda antes de proceder à quantificação final, cada gama de concentração foi dividida em cinco pontos equidistantes, e para cada ponto foi estimada a resposta instrumental a obter de forma a garantir que não ocorreria sobreposição de sinais para cada concentração. Esta avaliação foi mais uma vez efectuada recorrendo à informação previamente obtida durante o estudo do desempenho do cromatógrafo, recorrendo às equações das rectas dos

gráficos de área vs. concentração de ião (mg L^{-1}) e s vs. concentração de ião (mg L^{-1}). Mostra-se na tabela 27 a avaliação da dispersão do sinal esperado para os cinco níveis de concentração na gama de concentrações mais estreita estudada para o ião nitrato (5,7 – 9,7 mg L^{-1}).

Tabela 27: Variabilidade esperada dos sinais na curva de adição de padrão utilizada na determinação do ião nitrato na amostra 36 A, considerando um nível de confiança de, aproximadamente, 95 %.

$C_{\text{NO}_3^-}/\text{mg L}^{-1}$	A_{esperada}	s_{esperado}	$2 \times s$	$A+2s$	$A-2s$
5,7	319378	9314,39	18628,78	338007	300750
6,7	376511	10727,09	21454,18	397966	355057
7,7	433644	12139,79	24279,58	457924	409365
8,7	490777	13552,49	27104,98	517882	463672
9,7	547910	14965,19	29930,38	577841	517980

Com os valores apresentados na tabela 27, foi traçado um gráfico de $A \pm 2s$ vs. concentração de ião (mg L^{-1}), figura 17, para melhor visualização dos resultados.

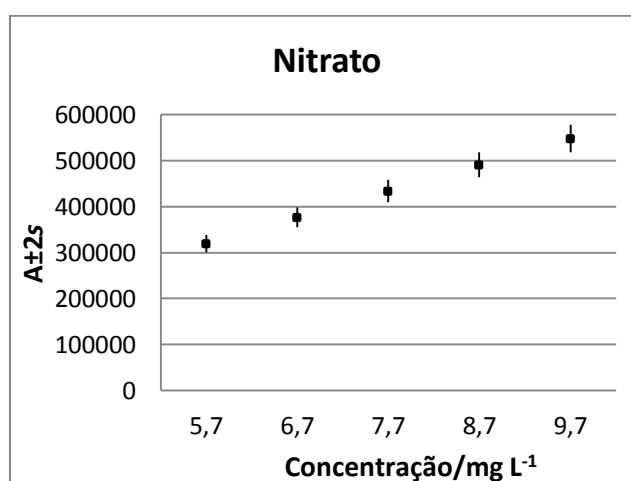


Figura 17: Representação gráfica da variabilidade esperada dos sinais da curva de adição de padrão utilizada na determinação do ião nitrato na amostra 36 A.

Avaliando os valores da tabela 27 e figura 17, verifica-se que as áreas não se sobrepõem, podendo-se prosseguir com as análises.

7.3.2. Análise das amostras de água salgada

Neste ponto descreve-se a caracterização da composição iónica das águas salgadas analisadas. Esta descrição será ilustrada com os dados em bruto e cálculos envolvidos na análise da amostra 36 A.

7.3.2.1. Determinação das concentrações de iões

Após a análise preliminar da composição iónica da amostra, prosseguiu-se com a quantificação da fracção iónica das águas salgadas.

Na sequência das medições cromatográficas, os valores das áreas dos picos foram recolhidos. A tabela 28 apresenta os sinais das calibrações pelo método de adição de padrão.

Tabela 28: Valores de áreas dos picos obtidos para cada medida replicada das soluções utilizadas na caracterização da amostra 36 A pelo método de adição de padrão (A0, A1, A2, A3, A4).

	A_F^-		A_{Cl}^-			$A_{NO_2}^-$		A_{Br}^-		$A_{NO_3}^-$	
Solução	Rep.1	Rep. 2	Rep.1	Rep. 2	Rep. 3	Rep.1	Rep. 2	Rep.1	Rep. 2	Rep.1	Rep. 2
36 A 0	-	1390	170467	168132	176754	7344	7570	35919	36440	258357	258435
36 A 1	34211	30690	241103	235909	245711	7727	7940	109762	101634	670685	657128
36 A 2	40598	42387	297817	297477	299444	16655	17436	145902	140826	731064	740959
36 A 3	53748	58101	341415	339359	339862	25392	24350	192448	172873	804461	798257
36 A 4	63791	70954	369155	372409	371661	38033	33024	236299	235561	864166	846167

Com os valores de áreas dos picos obtidos, traçaram-se as curvas para o método de adição de padrão para cada ião. A figura 18 apresenta a curva de determinação do ião nitrato, para uma diluição de amostra de 50 vezes.

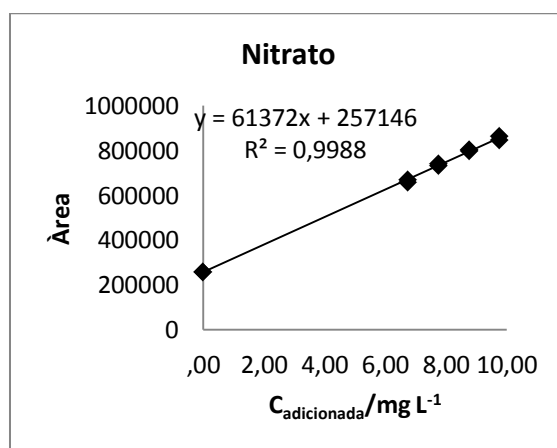


Figura 18: Curva de calibração para a quantificação da concentração de íon nitrato na amostra 36 A, pelo método de adição de padrão.

A partir das equações das rectas para cada íon, foram determinadas as concentrações na solução amostra diluída (C_{recta}), dividindo o valor da ordenada na origem pelo valor do declive; esta concentração foi, posteriormente, multiplicada pelo factor de diluição para estimar a concentração da amostra original (C_{amostra}) (tabela 29).

Tabela 29: Concentrações (mg L^{-1}) estimadas para cada íon nas amostras de água salgada analisadas.

Amostra	C_{F}^{-}		C_{Cl}^{-}		$C_{\text{NO}_2}^{-}$		C_{Br}^{-}		$C_{\text{NO}_3}^{-}$	
	C_{recta}	C_{amostra}	C_{recta}	C_{amostra}	C_{recta}	C_{amostra}	C_{recta}	C_{amostra}	C_{recta}	C_{amostra}
36 A	0,059	2,9	1,588	15876,8	0,091	4,6	0,822	41,1	4,190	209,5
36 D	-0,006	-0,3	1,567	15673,4	0,173	8,7	0,819	41,0	4,074	203,7
35 A	0,016	0,8	1,511	15113,1	0,249	12,4	1,090	54,5	2,133	106,7
35 D	0,028	1,4	1,591	15905,9	0,313	15,7	1,047	52,3	1,836	91,8

7.3.2.2. Cálculo da incerteza expandida, U_y

Para o cálculo da incerteza neste tipo de amostras, o diagrama de causa-efeito é ligeiramente diferente do diagrama da figura 6, uma vez que neste caso não se dilui uma toma de amostra medida por pesagem. Assim, o diagrama de causa-efeito a acompanhar neste cálculo será o da figura 19.

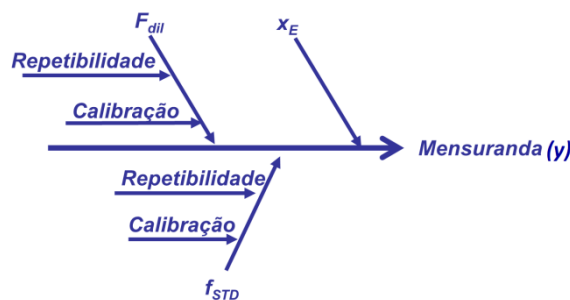


Figura 19: Diagrama de causa-efeito para a determinação da concentração de um ião específico, numa amostra de água salgada.

Para o cálculo da incerteza padrão relativa combinada, obedecendo à lei da propagação das incertezas, utiliza-se a equação 55 considerando as componentes representadas no diagrama da figura 19.

$$\frac{u_y}{y} = \sqrt{\left(\frac{u_{F_{dil}}}{F_{dil}}\right)^2 + \left(\frac{u_{f_{STD}}}{f_{STD}}\right)^2 + \left(\frac{s_{x_E}}{x_E}\right)^2} \quad (55)$$

Para o cálculo da componente de incerteza associada à diluição da amostra recorreu-se à equação 22, e tendo em conta que, para todas as amostras, a diluição para a análise dos iões F^- , NO_2^- , Br^- e NO_3^- foi a mesma, usando o mesmo tipo de material (pipeta de 1 mL e balão volumétrico de 50 mL, de classe AS e A, respectivamente) esta componente de incerteza é igual para aqueles iões. Na análise do Cl^- foi necessário proceder a uma diluição superior, em que também foi usado o mesmo tipo de material para todas as amostras (pipeta de 1 mL e balão volumétrico de 100 mL, de classe AS e A, respectivamente).

Na tabela 30, são apresentados os valores de incerteza padrão relativa, $u'_{F_{dil}}$, associada à diluição da amostra para cada ião, para todas as amostras.

Tabela 30: Valores de $u'_{F_{dil}}$, para cada ião, para todas as amostras.

	F^-	Cl^-	NO_2^-	Br^-	NO_3^-
$u'_{F_{dil}}$	0,0110	0,0109	0,0110	0,0110	0,0110

A incerteza padrão relativa associada à concentração da solução padrão adicionada às amostras diluídas, u'_{STD} , tem como componentes, as incertezas associadas à concentração da solução mãe preparada a partir de um sal puro, u'_{STD} , à diluição a que é sujeita, $u'_{\text{Fdil STD}}$, e à adição dos diferentes volumes a cada solução amostra diluída. Esta última componente foi avaliada, relativamente à capacidade de assegurar razões de adições com incerteza relativa desprezável, considerando a precisão relativa da resposta instrumental.

Na tabela 31 estão expressas as incertezas expandidas das soluções padrão preparadas a partir do sólido, para cada ião, das quais, recorrendo à equação 39, se calcula a incerteza u'_{STD} .

Tabela 31: Concentração inicial e correspondentes incertezas expandida e relativa das soluções padrão mãe dos iões analisados.

	F ⁻	Cl ⁻	NO ₂ ⁻	Br ⁻	NO ₃ ⁻
$C_{\text{inicial}}/\text{mg L}^{-1}$	1001,0	1000,0	1000,9	1038,6	1007,9
U_c	6,0	6,0	7,9	9,9	9,3
k	2	2	2	2	2
u'_{STD}	0,0030	0,0030	0,0039	0,0048	0,0046

A partir destas soluções padrão, foram preparadas soluções padrão diluídas, utilizando material do mesmo tipo (pipeta 10 mL e balão volumétrico 200 mL, de classe AS e A, respectivamente). O cálculo das incertezas associadas a essas diluições foi executado considerando a equação 22, e os valores obtidos são apresentados na tabela 32.

Tabela 32: Volumes envolvidos na diluição das soluções padrão mãe, $u'_{\text{Fdil STD}}$, para os iões analisados.

Ião	$V_{\text{padrão}}/\text{mL}$	$V_{\text{final}}/\text{mL}$	$u'_{V_{\text{padrão}}}$	$u'_{V_{\text{Final}}}$	$u'_{\text{Fdil STD}}$
F ⁻	1,0		0,0232		0,0232
Cl ⁻	10		0,0023		0,0023
NO ₂ ⁻	2,5	200	0,0093	0,00030	0,0093
Br ⁻	1,0		0,0232		0,0232
NO ₃ ⁻	7,0		0,0033		0,0033

A incerteza associada à adição de diferentes volumes de solução padrão diluída às amostras também foi calculada, para se avaliar se se verifica a condição imposta pela equação 41, já referida no ponto 7.1.2..

A tabela 33 apresenta as incertezas padrão relativas associadas à repetibilidade de medição dos dois menores volumes adicionados de cada ião, e considerando a informação obtida durante a execução do ponto 7.1.1., que permite afirmar que a razão das concentrações adicionadas é desprezável considerando a precisão relativa da resposta instrumental.

Tabela 33: Valores dos parâmetros necessários para a verificação de que a preparação das adições de padrão cumpre os pressupostos do modelo de regressão utilizado.

lão	u'_{VA}	u'_{VB}	u'_{VF}	R'_{max}	$S_{y/x}$ conc. +alta.	$Y_{conc. +alta}$	$[s/Y]/3$
F ⁻	0,0016	0,00087	0,00069	0,0021	12638	347882	0,0121
Cl ⁻	0,00080	0,00048	0,00058	0,0014	7535	215802	0,0116
NO ₂ ⁻	0,0019	0,0011	0,00069	0,0024	12091	290369	0,0139
Br ⁻	0,00080	0,00050	0,00069	0,0014	13963	451556	0,0103
NO ₃ ⁻	0,00050	0,00033	0,00069	0,0011	13017	567756	0,0076

Tendo em conta que $R'_{max} < ([s/Y]/3)$, pode-se considerar que a razão das concentrações de analito adicionadas é afectada de uma incerteza desprezável considerando a precisão relativa da resposta do cromatógrafo.

Assim, as incertezas padrão relativas associadas à concentração das soluções padrão adicionadas, de cada ião, são as que constam da tabela 34:

Tabela 34: Incertezas padrão relativas utilizadas no cálculo de u'_{fstd} .

lão	u'_{STD}	$u'_{Fdil STD}$	u'_{fstd}
F ⁻	0,0030	0,0232	0,0234
Cl ⁻	0,0030	0,0023	0,0038
NO ₂ ⁻	0,0039	0,0093	0,0101
Br ⁻	0,0048	0,0232	0,0237
NO ₃ ⁻	0,0046	0,0033	0,0057

Para o cálculo da componente de incerteza associada à extrapolação da curva de calibração considerou-se a equação 24 e os dados experimentais do sinal em função da concentração adicionada. Os valores de $s_{x\bar{e}}$ para cada ião em cada amostra são apresentados na tabela 35.

Tabela 35: Valores de s_{xE} , para os iões analisados nas amostras de água salgada.

	s_{xE}				
	F^-	Cl^-	NO_2^-	Br^-	NO_3^-
36 A	0,030	0,068	0,116	0,134	0,139
36 D	0,019	0,126	0,053	0,063	0,175
35 A	0,017	0,063	0,156	0,275	0,136
35 D	0,012	0,068	0,183	0,076	0,182

Conhecendo todas as incertezas padrão relativas associadas às diversas componentes de incerteza, calcula-se a incerteza padrão relativa combinada e a incerteza padrão expandida para cada ião (tabela 36), utilizando um factor de expansão igual a 2 para um nível de confiança de, aproximadamente, 95 %.

Tabela 36: Incertezas padrão relativas combinadas, u'_c , e incertezas padrão expandidas, U_c ($mg\ L^{-1}$), para os iões analisados nas amostras de água salgada.

Amostra	F^-		Cl^-		NO_2^-		Br^-		NO_3^-	
	u'_c	U_c	u'_c	U_c	u'_c	U_c	u'_c	U_c	u'_c	U_c
36 A	0,50	3,0	0,044	1408	1,3	12	0,17	14	0,035	15
36 D	3,0	-1,9	0,081	2542	0,31	5,3	0,082	6,7	0,045	18,
35 A	1,1	1,75	0,049	1486	0,63	16	0,25	28	0,069	15
35 D	0,44	1,26	0,050	1589	0,58	18	0,080	8,4	0,10	19

Reportam-se, na tabela 37, os valores de concentração de cada ião com a respectiva U_c , para cada amostra analisada.

Tabela 37: Concentrações e respectivas incertezas expandidas ($k=2$) dos iões analisados em cada amostra.

Amostra	$(C_{i\tilde{a}o} \pm U_c)/\ mg\ L^{-1}$				
	F^-	$Cl^-/*$	NO_2^-	Br^-	NO_3^-
36 A	$2,9 \pm 3,0$	$15,8 \pm 1,4$	5 ± 12	41 ± 14	209 ± 15
36 D	$-0,3 \pm 1,9$	$15,7 \pm 2,5$	$8,7 \pm 5,3$	$41,0 \pm 6,7$	204 ± 18
35 A	$0,8 \pm 1,8$	$15,1 \pm 1,5$	12 ± 16	54 ± 28	107 ± 15
35 D	$1,4 \pm 1,3$	$15,9 \pm 1,6$	16 ± 18	$52,3 \pm 8,4$	92 ± 19

* $g\ L^{-1}$

7.3.2.3. Compatibilidade dos resultados de águas salgadas antes e depois do tratamento

Para avaliar a compatibilidade metrológica entre de amostras de águas do mesmo aquário antes e após tratamento, isto é, entre as amostras A e D de cada aquário, foi realizado o seguinte teste:

$$|C_A - C_D| < 3 \times \sqrt{\left(\frac{U_{C_A}}{2}\right)^2 + \left(\frac{U_{C_D}}{2}\right)^2} \quad (56)$$

em que C_A e C_D são as concentrações das amostras A e D, respectivamente, de cada aquário, e U_{C_A} e U_{C_D} as incertezas padrão expandidas ($k=2$) dessas mesmas amostras. Se o valor absoluto da diferença entre as concentrações for superior a 3 vezes a incerteza padrão da diferença, então os resultados não são compatíveis, podendo isto significar que a medição não está correcta, ou que a concentração nas soluções é significativamente diferente [38]. Considerando as características do sistema estudado, apenas se prevê uma redução na concentração dos compostos de azoto após o tratamento realizado à água do aquário.

O estudo de compatibilidade está associado a um nível de confiança de, aproximadamente, 99 %.

Na tabela 38, são apresentados os parâmetros calculados durante realização deste teste, para as concentrações de iões analisados nas amostras dos dois aquários (35 e 36).

Tabela 38: Parâmetros calculados para o teste de compatibilidade entre as concentrações de iões antes e após tratamento das águas dos aquários número 36 e 35 do Aquário Vasco da Gama.

Iões	Aquário 36		Aquário 35	
	$ C_A - C_D $ / mg L ⁻¹	$3 \times \sqrt{\left(\frac{U_{C_A}}{2}\right)^2 + \left(\frac{U_{C_D}}{2}\right)^2}$	$ C_A - C_D $ / mg L ⁻¹	$3 \times \sqrt{\left(\frac{U_{C_A}}{2}\right)^2 + \left(\frac{U_{C_D}}{2}\right)^2}$
F ⁻	3,3	5,2	0,6	3,2
Cl ⁻	0,2*	4,4	0,8*	3,3
NO ₂ ⁻	4	19	3	36
Br ⁻	0,1	14	2	43
NO ₃ ⁻	6	35	15	36

*g L⁻¹

Numa primeira análise dos valores da tabela 38, verifica-se que as concentrações de iões nas águas do mesmo aquário, antes (A) e depois (D) do tratamento, são metrologicamente compatíveis.

Após uma análise mais cuidada dos dados divulgados nesta alínea, podemos concluir que apesar de ser observada uma ligeira redução da concentração de ião nitrato após o tratamento da água dos aquários, o procedimento de medição não consegue distinguir as concentrações das águas salgadas. As concentrações estimadas de ião fluoreto e ião nitrito, são menores que os limites de detecção visto que os intervalos estimados para um nível de confiança de 99 %, considerando um factor de expansão de 3, em vez do factor 2 usado na tabela 37, incluem o valor zero. Não são observadas alterações significativas nas concentrações dos iões cloreto e brometo, possivelmente porque estes parâmetros não são significativamente alterados nos processos biológicos envolvidos no tratamento.

Os resultados permitem confirmar que a contaminação de nitratos nas águas dos aquários tende a ser maior em sistemas de menor volumetria e menor densidade populacional de espécies equivalentes.

7.3.3. Análise de água de mar artificial

Após a determinação preliminar da concentração de cada ião, prosseguiu-se com a quantificação da composição iónica da água artificial com composição conhecida.

No fim das análises, foram recolhidos os valores das áreas dos picos dos diversos iões, para cada solução, foram recolhidos (tabela 39).

Tabela 39: Valores das áreas dos picos obtidos para cada solução de água de mar artificial utilizados na quantificação pelo método de adição de padrão.

Adição	A_{F^-}	A_{Cl^-}	$A_{NO_2^-}$	A_{Br^-}	$A_{NO_3^-}$	$A_{SO_4^{2-}}$
0	8417	196427	13868	55183	236278	735395
1ª	30779	266896	33452	179986	521035	1581722
2ª	44334	308173	37001	275726	654677	1902368
3ª	47551	410494	41911	345789	715806	1994097
4ª	63661	421634	54319	432855	832928	2229561

Com os valores de áreas obtidos, traçaram-se as curvas para o método de adição de padrão (figura 20) para cada ião.

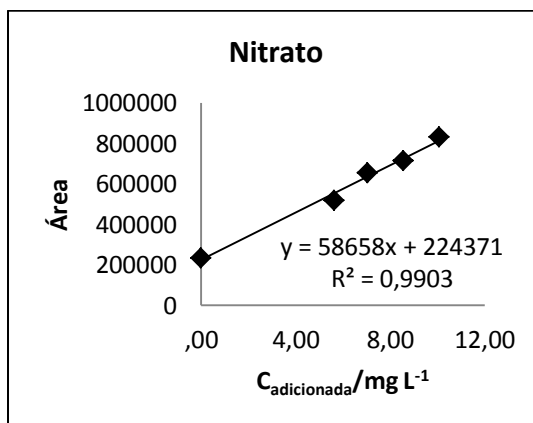


Figura 20: Curva de calibração, para a determinação do ião nitrato na água de mar artificial, pelo método de adição de padrão.

A partir das equações das rectas, foram determinadas as concentrações na água do mar diluída analisada (C_{recta}) e multiplicando pelo factor de diluição obtêm-se os valores de concentração dos iões na amostra original ($C_{amostra}$) (tabela 40).

Tabela 40: Concentrações estimadas (mg L^{-1}) para a análise da composição iónica da amostra da água de mar artificial analisada.

	C_F^-		$C_{Cl}^- *$		$C_{NO_2}^-$		C_{Br}^-		$C_{NO_3}^-$		$C_{SO_4}^{2-}$	
	C_{recta}	$C_{água}$	C_{recta}	$C_{água}$	C_{recta}	$C_{água}$	C_{recta}	$C_{água}$	C_{recta}	$C_{água}$	C_{recta}	$C_{água}$
Art.	0,10	4,9	0,0016	15,9	0,40	19,9	1,29	64,7	3,82	191,2	9,71	485,6

*g L⁻¹

O cálculo das incertezas associadas à medição regem-se pelo mesmo diagrama apresentado para a análise de amostras de água salgada (figura 20).

A incerteza associada à diluição desta amostra foi calculada como explicado no ponto 7.3.2.2., uma vez que as diluições realizadas foram as mesmas que para a análise das soluções de amostras de água salgada. Assim, na tabela 41, são apresentados os valores de incerteza associada à diluição da água artificial para cada ião.

Tabela 41: Valores de u'_{Fdil} , para cada íão, para a análise da água de mar artificial.

	F^-	Cl^-	NO_2^-	Br^-	NO_3^-	SO_4^{2-}
u'_{Fdil}	0,0110	0,0109	0,0110	0,0110	0,0110	0,0110

A incerteza associada à concentração da solução padrão adicionada à amostra, u'_{fSTD} , tem como componentes, as incertezas associadas à concentração da solução mãe preparada a partir do sólido, u'_{STD} , à diluição a que é sujeita, $u'_{Fdil STD}$, e à adição dos diferentes volumes a cada solução para a adição de padrão.

As soluções padrão adicionadas às soluções de água de mar artificial, foram as utilizadas nas adições às soluções de amostras de água salgada, como tal, os cálculos realizados para a determinação das incertezas associadas às soluções padrão adicionadas são semelhantes, apresentando-se na tabela 42 os valores destas incertezas.

Tabela 42: Incertezas padrão relativas utilizadas no cálculo de u'_{fstd} .

Íão	u'_{STD}	$u'_{Fdil STD}$	u'_{fstd}
F^-	0,0030	0,0232	0,0234
Cl^-	0,0030	0,0023	0,0038
NO_2^-	0,0039	0,0093	0,0101
Br^-	0,0048	0,0232	0,0237
NO_3^-	0,0046	0,0033	0,0057
SO_4^{2-}	0,0023	0,0024	0,0033

Para o cálculo da componente de incerteza associada à extrapolação da curva de calibração considerou-se a equação 24 e os sinais instrumentais. Os valores de s'_{xE} para cada íão, na água de mar artificial, são apresentados na tabela 43.

Tabela 43: Valores de s'_{xE} , para as concentrações de íões estimadas na solução diluída de água de mar artificial.

	s_{xE}/x_E					
	F^-	Cl^-	NO_2^-	Br^-	NO_3^-	SO_4^{2-}
Artificial	0,40	0,12	0,26	0,12	0,089	0,063

Conhecendo as incertezas padrão relativas associadas às componentes de incerteza da determinação da concentração de iões, calcula-se a incerteza padrão relativa combinada, u'_c , e a incerteza padrão expandida, U_c para cada analito (tabela 44), utilizando um factor de expansão igual a 2 para um nível de confiança de, aproximadamente, 95 %.

Tabela 44: Incertezas padrão relativas combinadas, u'_c , e incertezas expandidas, U_c (mg L^{-1}), para as concentrações estimadas de iões na água de mar artificial.

	F ⁻		Cl ⁻ *		NO ₂ ⁻		Br ⁻		NO ₃ ⁻		SO ₄ ²⁻	
	u'_c	U_c	u'_c	U_c	u'_c	U_c	u'_c	U_c	u'_c	U_c	u'_c	U_c
Art	0,41	3,9	0,16	5,1	0,26	10	0,12	15	0,090	35	0,064	62

*g L⁻¹

Reportam-se, na tabela 45, os valores de concentrações de cada ião com a respectiva U_c , para a água de mar artificial.

Tabela 45: Concentrações e respectivas incertezas expandidas ($k=2$) dos iões analisados na água de mar artificial em cada amostra.

	$(C_{\text{ião}} \pm U_c) \text{ mg L}^{-1}$					
	F ⁻	Cl ⁻ *	NO ₂ ⁻	Br ⁻	NO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻
Artificial	$4,9 \pm 3,9$	$15,9 \pm 5,1$	20 ± 10	65 ± 15	191 ± 34	486 ± 62

*g L⁻¹

7.3.4. Controlo interno de qualidade

Para assegurar o controlo interno de qualidade dos resultados, procedeu-se ao cálculo do coeficiente de correlação linear de Pearson entre os sinais instrumentais e a adição de analito e à análise de ensaios brancos e de duplicados de uma solução de água do mar com concentrações de iões conhecidas.

O coeficiente de Pearson, r , avalia a correlação linear entre as variáveis, área e concentração, utilizadas para traçar a curva de calibração. Tendo em conta que o valor deste parâmetro é afectado pela dispersão da resposta instrumental, que é independente da tendência linear dos sinais em função da concentração, optou-se por usar um critério

estatístico para a avaliação deste parâmetro. O valor mínimo de r que indica a correlação das variáveis é definido considerando o nível de confiança da avaliação e o número de pontos, n , usados para traçar a curva [40]. Os valores de coeficiente de correlação obtidos em diversas curvas de calibração, foram comparados com os valores críticos de r tabelados (anexo A3), para um nível de confiança de 95 % e $(n-2)$ graus de liberdade. Se o valor de r obtido for superior ao valor tabelado, considera-se que existe correlação linear significativa entre as variáveis. Os desvios aceites entre o r estimado e o valor máximo de 1 serão então justificáveis pela precisão das medições.

A tabela 46 apresenta os valores deste coeficiente obtidos para cada ião, em cada amostra, e o valor crítico tabelado para um nível de confiança de 95 % e 3 graus de liberdade.

Tabela 46: Valores do coeficiente de correlação linear de Pearson, r , estimados na análise das diversas amostras e valor de r máximo tabelado (r_{tab}) para um nível de confiança de 95 %.

	r_{Pearson}						r_{tab}
	F^-	Cl^-	NO_2^-	Br^-	NO_3^-	SO_4^{2-}	
36A	0,9794	0,9959	0,9134	0,9952	0,9994	-	
36D	0,9876	0,9859	0,9219	0,9988	0,9989	-	
35A	0,9858	0,9965	0,9730	0,9870	0,9989	-	0,878
35D	0,9924	0,9931	0,8664	0,9990	0,9979	-	
Art*	0,9820	0,9901	0,9848	0,9993	0,9951	0,9966	

*amostra de água de mar artificial

Na avaliação do sinal do branco, considerou-se a condição [40]:

$$\text{sinal}_{\text{branco}} \leq 3 \times s_{y/x} \quad (57)$$

Segundo este parâmetro, para garantir a qualidade dos resultados, o sinal do branco não deve ser superior a 3 vezes o desvio padrão residual da curva de calibração, $s_{y/x}$, que corresponde ao sinal no limite de detecção.

Para avaliar a repetibilidade das medições, foi avaliada a concordância entre duplicados de extrapolação de curvas de calibração. Apresentam-se na tabela 47, a título de exemplo, os valores usados na avaliação da concordância de duplicados da análise das amostras 36 A e 35 A obtidos em condições de repetibilidade. Neste caso, os duplicados são aceites se o módulo da diferença das concentrações estimadas por extrapolação, é menor ou igual ao limite de repetibilidade estimado considerando a média dos desvios padrão de extrapolação, s_{xE} , o número de graus de liberdade associados a este desvio padrão e um nível de confiança de 99 %. Pode-se observar que os duplicados estimados são concordantes para um nível de confiança de 99 %, à excepção da determinação de brometos na amostra 36 A. Esta determinação será oportunamente repetida.

Tabela 47: Parâmetros para o teste de compatibilidade entre as medições replicadas das soluções das amostras 36 A e 35 A.

Iões	Amostra 36 A		Amostra 35 A	
	$ C_1 - C_2 $ /mg L ⁻¹	$t \times \sqrt{2} \times s_{xE}^*$ /mg L ⁻¹	$ C_1 - C_2 $ /mg L ⁻¹	$t \times \sqrt{2} \times s_{xE}^*$ /mg L ⁻¹
F ⁻	0,81	1,58	0,030	0,168
Cl ⁻	0,364	0,451	0,275	0,372
NO ₂ ⁻	0,230	0,499	0,10	2,09
Br ⁻	1,071	0,372	0,52	2,10
NO ₃ ⁻	0,046	0,938	0,1	10,3

*t é a função t-student para n-2 graus de liberdade um nível de confiança de 99 %.

Para completar o controlo de qualidade dos resultados, foi realizado um teste de compatibilidade metrológica, entre as concentrações de iões estimadas e esperadas, de uma água do mar com composição iónica conhecida. A compatibilidade entre concentrações foi avaliada considerando a equação 56.

Os valores dos parâmetros calculados no estudo de compatibilidade são apresentados na tabela 48. Neste caso, é possível verificar que os pares de resultados são compatíveis, comprovando a qualidade das medições.

Tabela 48: Valores utilizados para o teste de compatibilidade entre concentrações estimadas e esperadas de uma água de mar artificial.

Íão	$C_{\text{esp}}/\text{mg L}^{-1}$	$C_{\text{obt}}/\text{mg L}^{-1}$	$ C_{\text{esp}} - C_{\text{obt}} $ / mg L^{-1}	$3 \times \sqrt{(U_{C_{\text{obt}}})^2 + (U_{C_{\text{esp}}})^2}$ / mg L^{-1}
F^-	1,5	4,9	3,4	5,9
NO_2^-	10,0	19,9	9,9	15
Br^-	67,5	64,7	2,8	23
NO_3^-	207,0	191,2	15,7	52
SO_4^{2-}	501,1	485,6	15,5	93
Cl^-	19,7*	15,9*	3,8*	7,7*

* g L^{-1}

8. Conclusões e perspectivas futuras

O processo de optimização da incerteza associada à determinação da composição iónica de amostras salinas foi realizado, com vista à obtenção de resultados com elevada qualidade metrológica e futura aplicação a outro tipo de amostras de interesse ambiental.

Neste estudo, a determinação da composição iónica das amostras salinas foi realizada por cromatografia iónica com detecção condutimétrica e a incerteza foi quantificada seguindo a abordagem subanalítica.

A optimização da incerteza da medição baseou-se nos modelos definidos para a regressão linear não ponderada e para a determinação da incerteza de extrapolação da curva de calibração do método de adição de padrão. A estratégia de optimização foi desenvolvida tendo em conta a necessidade do cumprimento dos pressupostos do modelo de regressão relativamente às adições de padrão e da homogeneidade de variâncias da resposta instrumental.

Concluiu-se que, tendo o conhecimento prévio aproximado da amostra, relativamente à concentração dos iões presentes, é possível definir a diluição da solução amostra e determinar o valor da concentração máxima de ião a ser adicionado no método de adição de padrão, de forma a minimizar a incerteza da determinação. Verificou-se que, para todos os iões, a U'_y estabiliza à medida que a concentração de ião aumenta, atingindo um patamar a cerca de 5 % de U'_y , mesmo quando não são efectuadas medidas replicadas. Concluiu-se também que são obtidos resultados menos incertos para três, ou mais, medidas replicadas das soluções de calibração.

No que diz respeito à análise de sais de sulfato e nitrato em cloreto de sódio purificado, a instrumentação cromatográfica disponível não permitiu uma separação eficiente do interferente cloreto capaz de possibilitar o aumento da toma de sólido de forma a garantir quantificações acima do limite de quantificação. O detector condutimétrico, a coluna cromatográfica e o eluente isocrático utilizados não permitiram a produção de resultados analíticos com elevada qualidade metrológica. As concentrações obtidas para cada uma das tomas para a análise do ião nitrato foram $[0; 30] \text{ mg L}^{-1}$ e $[0; 32] \text{ mg L}^{-1}$, em que as incertezas reportadas são incertezas expandidas, calculadas usando um factor de expansão igual a 3,707, correspondente a um nível de confiança de 99 %. Estes resultados indicam que os sinais obtidos podem ter sido produzidos na ausência de analito devido, em parte, à

dificuldade em purificar o óxido de prata utilizado para a remoção do ião cloreto da solução amostra. As concentrações de ião sulfato, obtidas para cada uma das tomas, foram de $(25 \pm 15) \text{ mg L}^{-1}$ e $(38 \pm 22) \text{ mg L}^{-1}$, em que as incertezas reportadas são incertezas expandidas, calculadas usando um factor de expansão igual a 2, correspondente a um nível de confiança de, aproximadamente, 95 %. As incertezas associadas às concentrações de ião sulfato correspondem a incertezas expandidas relativas de cerca de 60 %.

Na análise de amostras de água salgada, cedidas pelo Aquário Vasco da Gama, o objectivo foi obter resultados com elevada qualidade metrológica, seguindo o processo da optimização da incerteza de medição, e verificar se ocorreriam diferenças significativas entre as concentrações de iões na água dos aquários antes e depois do tratamento a que são sujeitas. Com a análise das amostras de água salgada, verificou-se que o estudo de optimização garante resultados de alta qualidade metrológica após adições de padrão em gamas largas e concentrações de iões elevadas. Observou-se, que os resultados obtidos para as amostras do mesmo aquário, isto é, antes e depois do tratamento, são compatíveis, e por isso, a metodologia de optimização da incerteza da medição não consegue comprovar a eficiência dos tratamentos realizados quando se recorre a apenas duas medições de cada solução de amostra.

A estratégia da optimização da incerteza associada à composição iónica das águas do mar foi avaliada através da análise de uma água de mar sintética. Neste caso, as concentrações estimadas e as concentrações esperadas para a água de mar sintética, são metrologicamente compatíveis.

O controlo interno das análises incluiu a realização de ensaios brancos, ensaios duplicados, avaliação da correlação linear da curva de calibração e a análise de materiais de referência como a água de mar sintética. Este trabalho apresenta, igualmente, critérios estatísticos e/ou metrológicos de aceitação dos resultados.

Como perspectiva futura é proposto a optimização da incerteza da determinação da composição catiónica de amostras salinas e a aplicação deste estudo de optimização a outro tipo de amostras de interesse ambiental.

9. Bibliografia e webgrafia

- [1] Marheni, P. R. H., McTaggart, A. R. "On-column matrix elimination of high levels of chloride and sulfate in non-suppressed ion chromatography" *Journal of Chromatography A* **546** 221-228 (1991).
- [2] Gros, N., Camões, M. F., Oliveira, C., Silva, R. "Ionic composition of seawaters and derived saline solutions determined by ion chromatography and its relation to other water quality parameters" *Journal of Chromatography A* **1210** 92-98 (2008).
- [3] Timerbaev, A., Fukushi, K. "Analysis of seawater and different highly saline natural water by capillary zone electrophoresis" *Marine Chemistry* **82** 221-238 (2003).
- [4] Libes, S. M. "An Introduction to Marine Biogeochemistry" *Elsevier Academic Press*, 2nd Ed. (2009).
- [5] Ito, K., Takayama, Y., Makabe, N., Mitsui, R., Hirokawa, T. "Ion chromatography for determination of nitrite and nitrate in seawater using monolithic ODS columns" *Journal of Chromatography A* **1083** 63-67 (2005).
- [6] Aquário Vasco da Gama [consultado a 27 de Agosto de 2012] Disponível em URL: http://aquariovgama.marinha.pt/PT/aquario/Pages/manutencao_especies_cativeiro.aspx
- [7] Aquário Vasco da Gama [consultado a 27 de Agosto de 2012] Disponível em URL: http://aquariovgama.marinha.pt/PT/aquario/Pages/analises_laboratoriais.aspx
- [8] Seawater [adaptado a 11 de Maio de 2012] Disponível em URL: <http://en.wikipedia.org/wiki/Seawater>
- [9] Jiang, X., Lim, L., Takeuchi, T. "Determination of trace inorganic anions in seawater samples by ion chromatography using silica columns modified with cetyltrimethylammonium ion" *Anal. Bioanal. Chem.* **393** 387-391 (2009).
- [10] Carrozzino, S., Righini, F. "Ion chromatographic determination of nutrients in sea water" *Journal of Chromatography A* **706** 277-280 (1995).
- [11] Documento que acompanhou a amostra de sal - Physikalisch-Technische Bundesanstalt.
- [12] Desai, A. S., Chougule, S. S. P., Sriram, M. "Chromatographic determination of anion in industrial salt and sodium chloride brines used in chlor-alkali industry" *Journal of Chromatography A* **841** 55-62 (1999).

- [13] Buchberger, W., Ahrer, W. "Combination of suppressed and non-suppressed ion chromatography with atmospheric pressure ionization mass spectrometry for the determination of anions" *Journal of Chromatography A* **850** 99-106 (1999).
- [14] Miskaki, P.; Lytras, E., Kousouris, L., Tzoumerkas, P. "Data quality in water analysis: validation of ion chromatographic method for the determination of routine ions in potable water" *Desalination* **213** 182-188 (2007).
- [15] Jackson, P., Weigert, C., Pohl, C., Sain, C. "Determination of inorganic anions in environmental waters with a hydroxide-selective column" *Journal of Chromatography A* **884** 175-184 (2000).
- [16] Hioki, A., McLaren, J. "Direct determination method of nitrate ions in seawater by UV-detection ion chromatography with hydrochloric acid/sodium chloride eluent" *AIST Bulletin of Metrology* **7** 51-59 (2008).
- [17] Novic, M., Divjak, B., Pihlar, B., Hudnik, V. "Influence of the sample matrix composition on the accuracy of the ion chromatographic determination of anions" *Journal of Chromatography A* **739** 35-42 (1996).
- [18] Dahllöf, I., Svensson, O., Torstensson, C. "Optimising the determination of nitrate and phosphate in sea water with ion chromatography using experimental design" *Journal of Chromatography A* **771** 163-168 (1997).
- [19] Stefanovic, S. C., Bolanca, T., Curkovic, L. "Simultaneous determination of six inorganic anions in drinking water by non-suppressed ion chromatography" *Journal of Chromatography A* **918** 325-334 (2001).
- [20] Umile, C., Huber, J. "Significant reduction of the detection limit in ion chromatography by relative analyte enrichment with column switching" *Journal of Chromatography A* **723** 11-17 (1996).
- [21] Zakaria, P., Bloomfield, C., Shellie, R. A., Haddad, P. R., Dicoski, G. W. "Determination of bromate in sea water using multi-dimensional matrix-elimination ion chromatography" *Journal of Chromatography A* **1218** 9080-9085 (2011).
- [22] Fu, H., Zhao, L., Luo, M., Zhang, H., Zhang, J. "Determination of chloroacetic acids in drinking water by ion chromatography using silver oxide as precipitant eliminating interference of chlorate in matrix" *Chinese Journal of Analytical Chemistry* **36** 1407-1410 (2008).

- [23] Hu, W., Cao, S., Tominaga, M., Miyazaki, A. "Direct determination of bromide ions in sea water by ion chromatography using water as the mobile phase" *Analytical Chimica Acta* **322** 43-47 (1996).
- [24] Prusisz, B., Grymuza, K., Pohl, P. "Interferences elimination in ion chromatography by inclusion of the interfering ion into the mobile phase - Analysis of fluoride in chloride rich dietary samples" *Talanta* **71** 1364-1368 (2007).
- [25] Suzuki, A., Lim, L., Hiroi, T., Takeuchi, T. "Rapid determination of bromide in seawater samples by capillary ion chromatography using monolithic silica columns modified with cetyltrimethylammonium ion" *Talanta* **70** 190-193 (2006).
- [26] Huang, Y., Mou, S., Liu, K., Rivielo, J. "Simplified column switching technology for the determination of traces of anions in the presence of high concentrations of other anions" *Journal of Chromatography A* **884** 53-59 (2000).
- [27] Skoog, D. A., Holler, F. J., Crouch, S. R. "Principles of Instrumental Analysis" *Thomson Brooks/Cole* 6th Ed. (2007).
- [28] Lucy, C. A. "Review: Recent advances in ion chromatography: A perspective" *Journal of Chromatography A* **739** 3-13 (1996).
- [29] López-Ruiz, B. "Advances in the determination of inorganic anions by ion chromatography" *Journal of Chromatography A* **881** 607-627 (2000).
- [30] Buchberger, W. W. "Detection techniques in ion chromatography of inorganic ions" *Trends in Analytical Chemistry* **20** 296-303 (2001).
- [31] Pohl, C. A., Stillian, J. R., Jackson, P. E. "Factors controlling ion-exchange selectivity in suppressed ion chromatography – Review" *Journal of Chromatography A* **789** 29-41 (1997).
- [32] Haddad, P. R., Jackson, P. E. "Ion Chromatography – principles and applications" *Journal of Chromatography Library* **46** (1990).
- [33] Harris, D. C. "Quantitative Chemical Analysis" *W. H. Freeman and Company* 5th Ed. (1998).
- [34] Dionex "LC10 Chromatography Organizer Operator's Manual" *Dionex Corporation* (1993).
- [35] Dionex "Introduction to the Dionex DX500 Chromatography Systems" *Dionex Corporation* (1993).

- [36] Haddad, P. R., Jackson, P. E., Shaw, M. J. "Developments in suppressor technology for inorganic ions analysis by ion chromatography using conductivity detection" *Journal of Chromatography A* **1000** 725-742 (2003).
- [37] Dionex "CD20 Conductivity Detector Operator's Manual" *Dionex Corporation* (1996).
- [38] VIM-Guia ISO/IEC 99:2007 "Vocabulário Internacional de Metrologia" 3ª Ed.
- [39] Rienitz, O., Rohker, K., Schiel, D., Han, J., Oeter, D. "New equation for the evaluation of standard addition experiments applied to ion chromatography" *Microchimica Acta* **154** 21-25 (2006).
- [40] Miller, J., Miller, J. "Statistics and chemometrics for analytical chemistry" 5th Ed. *Pearson Education Limited* (2005).
- [41] Ribani, M., Jardim, I. "Validação em métodos cromatográficos e electroforéticos" *Química Nova* **27** 771-780 (2004).
- [42] Fachado, A. A. "Desenvolvimento de um modelo de medição detalhado para a determinação da composição iónica da fracção de aerossóis atmosféricos solúvel em água, por cromatografia iónica" Dissertação de Licenciatura em Química, Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (2011).
- [43] International Organization for Standardization "Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement" Genebra (1995).
- [44] Guia IPAC OGC007 "Guia para a Quantificação de Incerteza em Ensaios Químicos", (2007).
- [45] Silva, R. B. "Qualidade em Análise Química" Aulas de apoio Mestrado em Química e Química Tecnológica, Universidade de Lisboa, ano lectivo 2010/2011.
- [46] Silva, R. B. "Modelação do desempenho de métodos analíticos complexos" Tese de Doutoramento, Universidade de Lisboa, (2004).
- [47] Guia IPAC OGC002 "Guia para a Acreditação de Laboratórios Químicos", (2011).
- [48] Silva, R. J. N. B., Camões, M. F. "The Quality of Standards in Least Squares Calibrations" *Analytical Letters* **43** 1257-1266 (2010).
- [49] Ferreira, P. L. "Estatística Descritiva e Inferencial – Breves Notas" Aulas de apoio Faculdade de Economia, Universidade de Coimbra, 2005.
- [50] Tabela teste-F 99,5 % nível de confiança [consultado a 19 de Outubro de 2012] Disponível em URL: <http://downloads.hawkeslearning.com/Docs/StatisticsTables/F-Table%20with%20alpha%20at%200.005.pdf>

A1. Teste de *Grubbs*

No teste de *Grubbs* para identificar a presença de valores aberrantes únicos, o primeiro passo é ordenar, por ordem crescente, os valores obtidos e de seguida calcular os valores de G , para o valor máximo (x_{\max}) e para o valor mínimo (x_{\min}) observados, através das equações I e II, respectivamente.

$$G_{\max} = \frac{(x_{\max} - \bar{x})}{s} \quad (I)$$

$$G_{\min} = \frac{(\bar{x} - x_{\min})}{s} \quad (II)$$

onde s representa o desvio padrão considerando todos os valores observados.

No teste de *Grubbs* para detectar a presença de valores aberrantes emparelhados, são identificados os dois valores máximos observados, e os dois valores mínimos. Para detectar valores aberrantes antagónicos é identificado o conjunto dos valores máximo e mínimo. Neste caso, é calculado o G_{cal} :

$$G_{\text{cal}} = \frac{s_2}{s} \quad (III)$$

em que s representa o desvio padrão de todos os valores observados e s_2 representa o desvio padrão dos valores observados excluindo os dois valores máximos, os dois valores mínimos ou os valores antagónicos.

Em todos estes testes, se $G_{\text{cal}} \leq G_{\text{tab}}$, os valores são considerados não aberrantes. Por outro lado, se $G_{\text{cal}} > G_{\text{tab}}$, os valores estudados são considerados valores aberrantes e seguidamente são desprezados. Os valores de G_{tab} para um nível de confiança de 95 %, são apresentados na tabela 49.

Este último teste deve ser realizado apenas nos casos em que não são detectados valores aberrantes únicos.

Tabela 49: Valores críticos de G para o teste bilateral de valores aberrantes únicos, para um nível de confiança de 95 % [40].

Sample size	Critical value
3	1.155
4	1.481
5	1.715
6	1.887
7	2.020
8	2.126
9	2.215
10	2.290

A2. Repetibilidade e erro máximo de medições de massa e volume

Tabela 50: Valores da repetibilidade e erros máximos de medições de massa e volume realizados no decorrer do trabalho experimental. No caso das medições de volume, o erro máximo é estimado pela tolerância do valor nominal do volume.

Material (mL)	Repetibilidade	Erro máximo
Balança Analítica*	0,0001	0,0005
Pipeta 1 mL	0,0092	0,010
Pipeta 5 mL	0,0063	0,030
Pipeta 10 mL	0,0019	0,040
Pipeta 20 mL	0,0167	0,060
Balão 10 mL	0,0068	0,025
Balão 50 mL	0,0139	0,060
Balão 100 mL	0,0061	0,100
Balão 200 mL	0,0130	0,100
Balão 500 mL	0,0175	0,250

*(g)

A3. Tabelas estatísticas

Tabela 51: Valores críticos da distribuição de t-Student [46].

Graus de liberdade	90 %	95 %	98 %	99 %
1	6,31	12,71	31,82	63,66
2	2,92	4,30	6,96	9,92
3	2,35	3,18	4,54	5,84
4	2,13	2,78	3,75	4,60
5	2,02	2,57	3,36	4,03
6	1,94	2,45	3,14	3,71
7	1,89	2,36	3,00	3,50
8	1,86	2,31	2,90	3,36
9	1,83	2,26	2,82	3,25
10	1,81	2,23	2,76	3,17
12	1,78	2,18	2,68	3,05
14	1,76	2,14	2,62	2,98
16	1,75	2,12	2,58	2,92
18	1,73	2,10	2,55	2,88
20	1,72	2,09	2,53	2,85
30	1,70	2,04	2,46	2,75
50	1,68	2,01	2,40	2,68
∞	1,64	1,96	2,33	2,58

Tabela 52: Valores críticos de coeficiente de correlação linear de Pearson para testes bilaterais (adaptada de [50]).

GL (N-2)	Nível de significância	
	.05	.01
1	0.9969	0.9999
2	0.9500	0.9900
3	0.8783	0.9587
4	0.8114	0.9172
5	0.7545	0.8745
6	0.7067	0.8343
7	0.6664	0.7977
8	0.6319	0.7646
9	0.6021	0.7348
10	0.5760	0.7079
11	0.5529	0.6835
12	0.5324	0.6614
13	0.5140	0.6411
14	0.4973	0.6226
15	0.4821	0.6055
16	0.4683	0.5897
17	0.4555	0.5751
18	0.4438	0.5614
19	0.4329	0.5487
20	0.4227	0.5368
25	0.3809	0.4869
30	0.3494	0.4487
35	0.3246	0.4182
40	0.3044	0.3932
45	0.2876	0.3721
50	0.2732	0.3542
60	0.2500	0.3248
70	0.2319	0.3017
80	0.2172	0.2830
90	0.2050	0.2673
100	0.1946	0.2540

Tabela 53: Valores críticos da distribuição de F de Fisher para um nível de confiança de 99,5 %

		Numerator Degrees of Freedom								
Denominator Degrees of Freedom		1	2	3	4	5	6	7	8	9
	1	16210.7227	19999.5000	21614.7414	22499.5833	23055.7982	23437.1111	23714.5658	23925.4062	24091.0041
	2	198.5013	199.0000	199.1664	199.2497	199.2997	199.3330	199.3568	199.3746	199.3885
	3	55.5520	49.7993	47.4672	46.1946	45.3916	44.8385	44.4341	44.1256	43.8824
	4	31.3328	26.2843	24.2591	23.1545	22.4564	21.9746	21.6217	21.3520	21.1391
	5	22.7848	18.3138	16.5298	15.5561	14.9396	14.5133	14.2004	13.9610	13.7716
	6	18.6350	14.5441	12.9166	12.0275	11.4637	11.0730	10.7859	10.5658	10.3915
	7	16.2356	12.4040	10.8824	10.0505	9.5221	9.1553	8.8854	8.6781	8.5138
	8	14.6882	11.0424	9.5965	8.8051	8.3018	7.9520	7.6941	7.4959	7.3386
	9	13.6136	10.1067	8.7171	7.9559	7.4712	7.1339	6.8849	6.6933	6.5411
	10	12.8265	9.4270	8.0807	7.3428	6.8724	6.5446	6.3025	6.1159	5.9676
	11	12.2263	8.9122	7.6004	6.8809	6.4217	6.1016	5.8648	5.6821	5.5368
	12	11.7542	8.5096	7.2258	6.5211	6.0711	5.7570	5.5245	5.3451	5.2021
	13	11.3735	8.1865	6.9258	6.2335	5.7910	5.4819	5.2529	5.0761	4.9351
	14	11.0603	7.9216	6.6804	5.9984	5.5623	5.2574	5.0313	4.8566	4.7173
	15	10.7980	7.7008	6.4760	5.8029	5.3721	5.0708	4.8473	4.6744	4.5364
	16	10.5755	7.5138	6.3034	5.6378	5.2117	4.9134	4.6920	4.5207	4.3838
	17	10.3842	7.3536	6.1556	5.4967	5.0746	4.7789	4.5594	4.3894	4.2535
	18	10.2181	7.2148	6.0278	5.3746	4.9560	4.6627	4.4448	4.2759	4.1410
	19	10.0725	7.0935	5.9161	5.2681	4.8526	4.5614	4.3448	4.1770	4.0428
	20	9.9439	6.9865	5.8177	5.1743	4.7616	4.4721	4.2569	4.0900	3.9564
	21	9.8295	6.8914	5.7304	5.0911	4.6809	4.3931	4.1789	4.0128	3.8799
	22	9.7271	6.8064	5.6524	5.0168	4.6088	4.3225	4.1094	3.9440	3.8116
	23	9.6348	6.7300	5.5823	4.9500	4.5441	4.2591	4.0469	3.8822	3.7502
	24	9.5513	6.6609	5.5190	4.8898	4.4857	4.2019	3.9905	3.8264	3.6949
	25	9.4753	6.5982	5.4615	4.8351	4.4327	4.1500	3.9394	3.7758	3.6447
	26	9.4059	6.5410	5.4091	4.7852	4.3844	4.1027	3.8928	3.7297	3.5989
	27	9.3423	6.4885	5.3611	4.7396	4.3402	4.0594	3.8501	3.6875	3.5571
	28	9.2838	6.4403	5.3170	4.6977	4.2996	4.0197	3.8110	3.6487	3.5186
	29	9.2297	6.3958	5.2764	4.6591	4.2622	3.9831	3.7749	3.6131	3.4832
	30	9.1797	6.3547	5.2388	4.6234	4.2276	3.9492	3.7416	3.5801	3.4505
	40	8.8279	6.0664	4.9758	4.3738	3.9860	3.7129	3.5088	3.3498	3.2220
	60	8.4946	5.7950	4.7290	4.1399	3.7599	3.4918	3.2911	3.1344	3.0083
	120	8.1788	5.5393	4.4972	3.9207	3.5482	3.2849	3.0874	2.9330	2.8083
	∞	7.8794	5.2983	4.2794	3.7151	3.3499	3.0913	2.8968	2.7444	2.6210

A4. Exemplos de cromatogramas

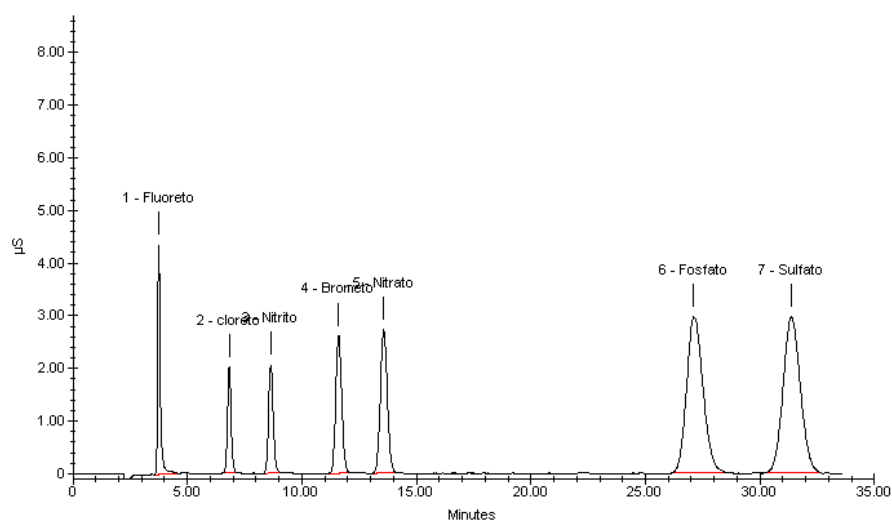


Figura 21: Exemplo de um cromatograma de uma mistura de aniões, obtido com uma coluna IonPac AS9 HC, segundo as condições descritas no ponto 6.4.2. para o cromatógrafo DX-500.

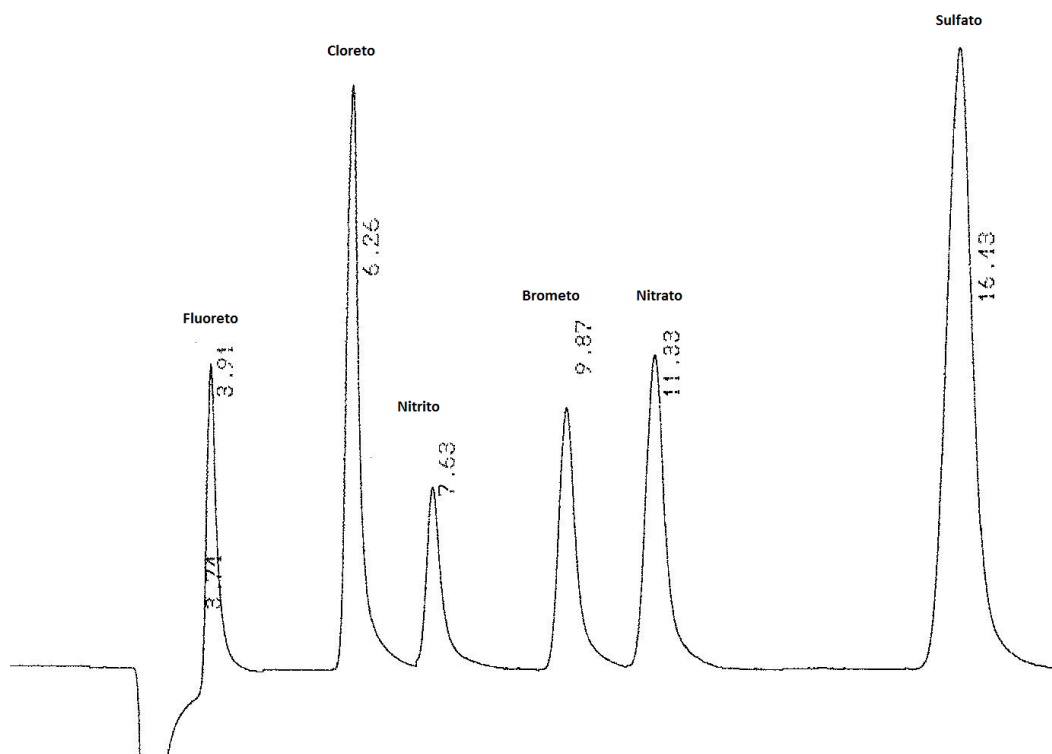


Figura 22: Exemplo de um cromatograma de uma mistura de aniões, obtido com uma coluna IonPac AS9 HC, segundo as condições descritas no ponto 6.4.2. para o cromatógrafo DX-300.

